

Erstcharakterisierung des C-Typ Lektin-ähnlichen Glykoproteins Clr-a

Dissertation
Emilia Rutkowski



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
DARMSTADT

**vom Fachbereich Chemie
der Technischen Universität Darmstadt**

zur Erlangung des Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

**Dissertation
von Emilia Rutkowski**

Erstgutachter: Prof. Dr. Harald Kolmar

Zweitgutachter: Prof. Dr. Alexander Steinle

Darmstadt 2019

Tag der Einreichung: 19. Dezember 2018

Tag der mündlichen Prüfung: 22. März 2019

Begeisterung ist ein Vulkan. In seinem Krater wächst kein Gras des Zauderns.
(Khalil Gibran, 1883-1931)

Danksagung

Diese Seite möchte ich nutzen, um meinen besonderen Dank all denjenigen Personen auszusprechen, die mich bei der Durchführung und Fertigstellung dieses Werkes unterstützt haben.

Ein sehr großer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Alexander Steinle, der es mir ermöglichte, diese Arbeit unter seiner Leitung am Institut für Molekulare Medizin in Frankfurt am Main anzufertigen. Die ausgezeichnete Ausstattung der Labore, das sehr gute familiäre Verhältnis im Team und das interessante Forschungsthema boten mir eine sehr gute Grundlage zur Durchführung dieser Arbeit. Vielen Dank für die hervorragende Betreuung, die vielen unterstützenden Diskussionen, das Korrekturlesen und die Geduld beim Fertigstellen dieser Arbeit.

Herrn Prof. Harald Kolmar danke ich für die hervorragende Betreuung an der TU Darmstadt. Vielen Dank für das Durchsehen dieser Arbeit und das Verständnis sowie die Möglichkeit und Motivation dieses Werk zu Ende zu bringen.

Vielen Dank an Herrn Dr. Stefan Leibelt für die Einarbeitung in das Thema, die stetige Hilfsbereitschaft und die vielen wertvollen Gespräche. Ein herzlicher Dank gilt Frau Christina Born für die immerwährend große Hilfe, das herzliche Empfangen bei jeder Fragestellung, die Unterstützung bei der Antikörperproduktion und das gemeinsame Durchleben der Experimente mit den Ratten.

Dr. Björn Bauer danke ich für die vielen tollen gemeinsamen wertvollen Momente, den interessanten und inspirierenden Austausch und die vielen schönen Stunden, in denen wir soviel gelacht haben.

Der gesamten AG Steinle danke ich für die den respektvollen tollen Umgang und das familiäre miteinander, sodass ich mich jeden Tag aufs Neue auf den Laboralltag gefreut habe.

Vielen Dank an Prof. Joachim Koch, Dr. Stefanie Memmer und Dr. Sandra Weil für die Zusammenarbeit und Unterstützung beim Epitope Mapping, Praveen Mathoor für die Zellsortierung und Dr. Henner Farin für die Zusammenarbeit und die Bereitstellung der Darm-Organoidkulturen.

Meinen Freunden, insbesondere Anika und Carolin, und Steffen M.-B. danke ich für die vielen unterstützenden Gespräche und das Verständnis für diesen sehr wichtigen Lebensabschnitt.

Mein besonderer Dank gilt meiner Mama Eva Rutkowski, die in jeder Situation für mich da ist und mich liebevoll und verständnisvoll in dieser Lebensphase begleitet hat. Danke!

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wird erstmalig das C-Typ Lektin-ähnliche Glykoprotein Clr-a charakterisiert, welches durch das Gen *Clec2e* im Natürlichen Killer Genkomplex (NKC) der Maus kodiert wird. Neben Clr-a sind noch weitere sechs Clr-Moleküle sowie der Aktivierungsmarker CD69 als Mitglieder der CLEC2 Genfamilie in dieser Region des NKC kodiert, daneben auch die Nkrp1 Immunrezeptoren, denen einige Clr-Moleküle als Liganden dienen.

Die Analyse von diversen Mausgeweben ergab, dass *Clec2e* selektiv im Gastrointestinaltrakt, und zwar vorwiegend im Dünndarm und im Kolon, transkribiert wird. Die erstmalige Generierung von Clr-a spezifischen monoklonalen Antikörpern im Rahmen dieser Arbeit ermöglichte sowohl die biochemische Charakterisierung des Clr-a Glykoproteins als auch die Darstellung dessen darmspezifischer Expression. Ähnlich wie andere Vertreter der CLEC2 Familie, wie z. B. das eng verwandte Clr-f, ist Clr-a als Disulfid-verknüpft, glykosyliertes Homodimer auf der Zelloberfläche von Transfektanten nachweisbar. Im Gegensatz zu Clr-f wird jedoch ein Großteil der Clr-a Moleküle intrazellulär zurückgehalten. Durchflusszytometrische Analysen von Clr-a/Clr-f Hybridmolekülen identifizierten Teile der *stalk*-Region sowie Teile der cytoplasmatischen Domäne der Clr-a Glykoproteine als diejenigen Bereiche, die diese intrazelluläre Retention determinieren.

Im Darmgewebe konnte mittels qPCR Analysen, Immunoblotting und Immunfluoreszenz eine prominente, homogene und exklusive Expression des Clr-a Glykoproteins durch intestinale Epithelzellen in Krypten und Villi gezeigt werden. Versuche mit Reporterzellen, die Clr-a Hybridrezeptoren exprimieren, sowie Bindungsversuche mit Clr-a Fc-Fusionsproteinen lieferten keinen Nachweis für die Existenz eines Clr-a Rezeptor. Eine postulierte Bildung von Heterodimeren durch Clr-a mit dem ebenfalls selektiv im Darmepithel exprimierten Clr-f wurde durch funktionelle Interaktionsstudien und die Analyse Clr-f defizienter Mäusen weitgehend ausgeschlossen. Eine mittels Poly(I:C) Injektion künstlich induzierte Darmentzündung führte zu einer schnellen und drastischen Herabregulierung der Clr-a Proteinexpression. In Versuchen mit *knock-out* Mäusen konnte gezeigt werden, dass dieses entzündungsvermittelte Auslöschen der Clr-a Expression durch den Immunrezeptor TLR3 vermittelt wird.

Die Ergebnisse dieser Arbeit beschreiben erstmalig die spezifische Expression des NKC-kodierten Glykoproteins Clr-a im Darmepithel der Maus. Die drastische Expressionsmodulation bei einer Darmentzündung deutet wie auch die Zugehörigkeit zur CLEC2 Genfamilie auf eine Funktion von Clr-a bei der Immunüberwachung des Darms hin.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	I
Zusammenfassung	II
Inhaltsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	IX
Abkürzungsverzeichnis	XII
1..... Einleitung	1
1.1 Der Darm	1
1.1.1 Aufbau des Gastrointestinaltraktes	1
1.1.2 Aufbau und Funktion des intestinalen Epithels	2
1.1.3 Die polarisierte Epithelzelle	3
1.1.4 Unterschiedliche Epithelzelltypen	4
1.1.5 Mukusschicht an der apikalen Grenze	5
1.1.6 Intestinale Stammzellnische	6
1.2 Das intestinale Immunsystem	8
1.2.1 Das Immunsystem des Darmes	8
1.2.2 Epithelzellen als zentrale Regulatoren der Immunantwort	9
1.2.3 Intraepitheliale Lymphozyten (IELs)	10
1.2.4 Mukosale IgA Sekretion	11
1.2.5 Erkennung von Pathogenen	11
1.2.6 Die Wirkung von Polyinosin-Polycytidyl-Säure (Poly (I:C)) auf den Darm	12
1.3 C-Typ Lektin-ähnliche Rezeptoren	14
1.3.1 Eigenschaften und Struktur von C-Typ Lektin-ähnlichen Rezeptoren	14
1.3.2 Der Natürliche Killer Genkomplex	16
1.3.3 NKC-kodierte Clr Moleküle und Nkrp1 Rezeptoren	16
1.3.4 Das C-Typ Lektin ähnliche Molekül Clr-a	20
1.4 Zielsetzung	23
2..... Materialien	24
2.1 Antikörper	24

2.2	Rekombinante Proteine	25
2.3	Bakterienstämme	26
2.4	Chemikalien	26
2.5	Enzyme	27
2.6	Größenstandards	27
2.7	Kit-Systeme	27
2.8	Laborgeräte	28
2.9	Oligonukleotide	29
2.10	Puffer und Lösungen	36
2.11	Vektoren	38
2.12	Verbrauchsmaterialien	40
2.13	Software	40
2.14	Sonstige Materialien	40
2.15	Sonstige Reagenzien	41
2.16	Zellkulturmedien und Zusätze	42
2.17	Zelllinien	43
3.....	Methoden	45
3.1	Molekularbiologische Methoden	45
3.1.1	Isolierung von RNA	45
3.1.2	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA	45
1.1.1.	DNase Verdau von RNA	46
3.1.3	cDNA-Synthese	46
3.1.4	Quantitative Echtzeit-PCR	46
3.1.5	Mutagenese – Restriktionsfreie Klonierung mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)	47
3.1.6	Restriktionsverdau	49
3.1.7	Ligation	49
3.1.8	Linearisierung und Fällung von DNA	50
3.1.9	Agarose-Gelelektrophorese	50
3.1.10	Reinigung von DNA-Fragmenten	51
3.1.11	Transformation von E. coli	51
3.1.12	Kolonie-PCR	51

3.1.13	Plasmidpräparation	52
3.1.14	Kryokonservierung von E. coli	53
3.2	Proteinbiochemische Methoden	54
3.2.1	Proteinreinigung	54
3.2.2	Ultrafiltration von Proteinen	55
3.2.3	Herstellung von Proteinlysaten	56
3.2.4	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	56
3.2.5	Immunpräzipitation	57
3.2.6	PNGaseF Behandlung von Proteinen	57
3.2.7	EndoH Behandlung von Proteinen	58
3.2.8	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	58
3.2.9	Silberfärbung von SDS-Gelen	59
3.2.10	Immunoblotting	60
3.2.11	Strippen von Membranen	61
3.2.12	Epitopkartierung der anti-Clr-a Antikörper 2E3 und 3C7	61
3.3	Immunologische Methoden	62
3.3.1	Durchflusszytometrie	62
3.3.2	Degranulationsanalyse mittels CD107a	62
3.3.3	Immunfluoreszenz	63
3.4	Zellbiologische Methoden	64
3.4.1	Kultivierung von eukaryotischen Zellen	64
3.4.2	Konservierung von eukaryotischen Zellen	65
3.4.3	Bestimmung der Lebendzellzahl	65
3.4.4	Transfektion von eukaryotischen Zellen	65
3.4.5	Produktion der Fc-Fusionsproteine	67
3.4.6	Elektroporation	67
3.4.7	Transduktion von BWN Reporterzellen	67
3.4.8	BWN-Reporterversuch	68
3.4.9	Isolation von Maus Milzzellen	69
3.4.10	Isolation der Ratten Milz und Blutentnahme	69

3.4.11	Fusion von Ratten Milzzellen mit P3x63Ag8.653 (P3X) -Zellen	69
3.4.12	Subklonierung der anti-Clr-a produzierenden Hybridome	71
3.4.13	Kultivierung von Hybridomen nach der Fusion	71
3.4.14	Isolierung von IELs, LPLs und IECs	71
3.4.15	Isolierung von intestinalen B und T Zellen	73
3.4.16	Isolierung von NK-Zellen	73
3.4.17	Isolierung von intestinalen Stammzellen und Stimulation von Organoidkulturen	73
3.5	Tierexperimentelle Methoden	74
3.5.1	Tierstämme	74
3.5.2	Immunisierung von Ratten	74
3.5.3	Behandlung von Mäusen mit Poly(I:C)	76
4.....	Ergebnisse	77
4.1	Gewebespezifische Expression von <i>Clec2e</i> im Gastrointestinaltrakt	77
4.2	Produktion und Validierung von monoklonalen Clr-a Antikörpern	78
4.2.1	Herstellung von löslichen Clr-a Ektodomänen	78
4.2.2	Produktion und Reinigung von monoklonalen anti-Clr-a Antikörpern	81
4.2.3	Validierung der monoklonalen Clr-a Antikörper 2E3 und 3C7	83
4.2.4	Epitopkartierung der Clr-a Antikörper 2E3 und 3C7	86
4.3	Molekulare Charakterisierung von Clr-a in vitro	87
4.3.1	Clr-a wird als glykosyliertes Homodimer auf der Zelloberfläche exprimiert	87
4.3.2	Intrazelluläre Retention von Clr-a Molekülen	89
4.4	Spezifische Clr-a Expression von intestinalen Epithelzellen	97
4.5	Strategien zur Identifikation eines potenziellen Clr-a Rezeptors	101
4.5.1	Detektion eines Clr-a Rezeptors mittels BWN-Reporterassays	101
4.5.2	Detektion eines Clr-a Rezeptors mittels Clr-a Fc-Fusionsproteinen	105
4.6	Mögliche Heterodimerbildung zwischen Clr-a und Clr-f	112
4.6.1	Einfluß von Clr-a auf die funktionelle Nkrp1g – Clr-f Interaktion	113
4.6.2	Clr-a/Clr-f Heterodimere als mögliche Liganden für Nkrp1-Rezeptoren	115
4.6.3	Nachweis von Clr-a im Darm nach Clr-f Immunpräzipitation	117
4.6.4	Clr-a Expression in Clr-f-defizienten Mäusen	118
4.7	Clr-a Expression unter inflammatorischen Bedingungen	120

4.7.1	Clr-a Expression wird nach Poly(I:C) - Behandlung stark herunterreguliert	120
4.7.2	Poly(I:C) vermittelte Expressionsregulation von Clr-a	122
4.8	Expressionsregulation von Clr-a in intestinalen Organoiden	124
5.....	Diskussion	126
5.1	Spezifische Expression von Clr-a im Darmepithel	126
5.2	Monoklonale Clr-a Antikörper 2E3 und 3C7	128
5.3	Intrazelluläre Retention von Clr-a	129
5.4	Identifizierung eines Clr-a Interaktionspartners	130
5.5	Heterodimerisierung von Clr-a und Clr-f	133
5.6	TLR3-vermittelte Expressionsmodulation von Clr-a	134
	Literaturverzeichnis	137
	Anhang	154

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Abschnitte des Gastrointestinaltraktes.	1
Abbildung 2: Schematischer Aufbau des Darmes.	3
Abbildung 3: Epitheliale Zelltypen im Dünndarm von Säugetieren.	5
Abbildung 4: Die intestinale Stammzellnische im Dünndarm und im Colon.	7
Abbildung 5: Induktive Strukturen und Effektorbereiche des mukosalen Immunsystems.	9
Abbildung 6: Intestinale Epithelzellen regulieren die angeborene und adaptive Immunität des Darmes.	10
Abbildung 7: Signalkaskaden nach viraler Detektion in konventionellen DCs.	13
Abbildung 8: Aufbau und Struktur von C-Typ Lektin-ähnlichen Rezeptoren.	15
Abbildung 9: Der Natürliche Killer Gen Komplex (NKC) in Mensch und Maus.	17
Abbildung 10: Genlokus, Domänenstruktur und Sequenzvergleich des von dem <i>Clec2e</i> Gen kodierten C-Typ Lektin-ähnlichen Moleküls Clr-a.	21
Abbildung 11. Clr-a wird ausschließlich im Darm exprimiert.	78
Abbildung 12. Produktion und Charakterisierung von löslichen Clr-a Ektodomänen.	80
Abbildung 13. Produktion und Charakterisierung von monoklonalen Clr-a spezifischen Ratten Antikörpern.	82
Abbildung 14. Spezifität der anti-Clr-a monoklonalen Antikörper 2E3 und 3C7.	84
Abbildung 15. Einsatz der monoklonalen anti-Clr-a Ak 2E3 und 3C7 in der Immunpräzipitation.	85
Abbildung 16. Identifizierung der Epitope der mAk Clr-a 2E3 und 4G7 sowie des Clr-a/Clr-f kreuzreaktiven mAk 3C7.	87
Abbildung 17. Clr-a ist ein disulfid-verknüpftes homodimeres Glykoprotein auf der Zelloberfläche. .	89
Abbildung 18. Clr-a weist eine schwächere Zelloberflächenexpression im Vergleich zu Clr-f auf.	90
Abbildung 19. Intrazelluläre Retention des Clr-a Glykoproteins.	92
Abbildung 20. Vergleich der Clr-a und Clr-f Aminosäuresequenzen.	93
Abbildung 21. Stalk-Bereich und cytoplasmatischer Proteinanteil sind für Regulation der Clr-a Oberflächenexpression verantwortlich. (A)	95
Abbildung 22. Schematische Darstellung der Clr-a/Clr-f Hybridproteine.	97

Abbildung 23. Clr-a Expression in intestinalen EpCAM-positiven Epithelzellen.	98
Abbildung 24. Clr-a Expression auf differenzierten Epithelzellen und Kryptzellen im Maudarm.	99
Abbildung 25. Clr-a wird auf intestinale Epithel im gesamten Gastrointestinaltrakt exprimiert.	101
Abbildung 26. BWN-Reporterassays liefern keinen Anhaltspunkt für eine Clr-a Rezeptor tragende Zellpopulation.	103
Abbildung 27. Herstellung und Analyse von hulG1 Fc-Fusionsproteinen.	106
Abbildung 28. Bindung der hulG1 Fc-Fusionsproteine Clr-f Fc und KACL Fc an den jeweiligen bekannten Rezeptor Nkrp1g oder Nkp65.	109
Abbildung 29. Färbungen diverser Zelllinien mit Clr-a Fc-Fusionsproteinen liefern keinen Nachweis für einen potenziellen Clr-a Rezeptor.	110
Abbildung 30. Färbung von Balb/C Dünndarmzellen mit Clr-a Fc Fusionsproteinen liefert keinen Nachweis für einen Clr-a Rezeptor.	112
Abbildung 31. Funktionelle Interaktion von Clr-f mit dessen inhibierenden Rezeptor Nkrp1g wird nicht beeinflusst durch Clr-a Ko-Expression.	114
Abbildung 32. Clr-a/Clr-f Heterodimerkomplex fungiert nicht als potenzieller Interaktionspartner in trans für Rezeptoren der Nkrp1 Familie.	116
Abbildung 33. Koimmunpräzipitation von Clr-a und Clr-f aus intestinalen Primärzellen einer C57BL/6 Maus.	117
Abbildung 34. Clr-a wird von Darmepithelzellen Clr-f defizienter Mäusen exprimiert.	119
Abbildung 35. Starke Herunterregulierung von Clr-a nach Poly(I:C) induzierter Immunaktivierung.	121
Abbildung 36. Modulation des Clr-a Expressionsverhaltens ist TLR3 abhängig.	123
Abbildung 37: IL-22, IFN β , TNF α oder IFN γ zeigen keinen Einfluss auf die Expression von Clr-a auf intestinalen Organoidkulturen aus C57BL/6 Mäusen.	125

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Humane NKRP-1-CLEC2 Interaktionspaare im Natürlichen Killer Genkomplex	18
Tabelle 2: Murine Nkrp-1-CLEC2 Interaktionspaare im Natürlichen Killer Genkomplex	18
Tabelle 3: Primärantikörper und Isotypkontrollen	24
Tabelle 4: Sekundärantikörper	25
Tabelle 5: Rekombinante Proteine	25

Tabelle 6: Bakterienstämme	26
Tabelle 7: verwendete Chemikalien	26
Tabelle 8: Enzyme für molekularbiologische und proteinbiochemische Methoden	27
Tabelle 9: Größenstandards für molekularbiologische und proteinbiochemische Methoden	27
Tabelle 10: Kit-Systeme	27
Tabelle 11: Laborgeräte	28
Tabelle 12: Oligonukleotide verwendet in quantitativer Echtzeit-PCR	29
Tabelle 13: Oligonukleotide verwendet zur Klonierung und Mutagenese	30
Tabelle 14: Puffer und Lösungen	36
Tabelle 15: Vektoren	38
Tabelle 16: Sonstige Materialien	40
Tabelle 17: Sonstige Reagenzien	41
Tabelle 18: Zellkulturmedien und Zusätze	42
Tabelle 19: Zusammensetzung der Hybridomamedien Hy1 – Hy 5	43
Tabelle 20: Zelllinien	43
Tabelle 21: cDNA-Synthese – Programm Thermocycler	46
Tabelle 22: Programm Thermomcyler – quantitative Echtzeit-PCR	47
Tabelle 23: Ansatz PCR1 – Amplifizierung Zielgen	48
Tabelle 24: Programm PCR1 – Amlifizierung Zielgen	48
Tabelle 25: Ansatz PCR 2 – Mutagenese mittels Mega-Primer	48
Tabelle 26: Programm PCR2 – Mutagenese mittels Mega-Primer	49
Tabelle 27: Ansatz Kolonie-PCR	52
Tabelle 28: Programm Kolonie-PCR	52
Tabelle 29: Antikörper-Konzentrationen in der Immunpräzipitation	57
Tabelle 30: Zusammensetzung der SDS-Trenngele (12 %, 10 %, 8 %, Angaben für zwei Gele)	59
Tabelle 31: Zusammensetzung des SDS-Sammelgels (4,5 %, Angaben für zwei Gele)	59
Tabelle 32: Antikörperkonzentrationen im Immunoblotting	61

Tabelle 33: Immunisierungsschema zur Produktion des monoklonalen anti-Clr-a Antikörpers 2E3 75

Tabelle 34: Immunisierungsschema zur Produktion des monoklonalen anti-Clr-a/Clr-f- Antikörpers
3C7 75

Abkürzungsverzeichnis

(RT)-PCR	Real-Time polymerase chain reaction
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
µm	Mikrometer
AF647	AlexaFluor647
Ag+	Silberion
AICL	Activation-induced C-type lectin
Ak	Antikörper
AMPs	anti-mikrobielle Produkte
AP1	activator protein 1
APC	Allophycocyanin
AS	Aminosäure
ATP	Adenintriphosphat
BACL	Brain-associated C-type lectin-like receptor
BALT	Bronchus-associated lymphoid tissue
BCR	B-Zell-Rezeptor
Bio	Biotinyliert
BMP	Bone morphogenetic protein
Bp	Basenpaar
BSA	Bovine Serum Albumin
CARD	Caspase activation and recruitment domain
CBC	cycling crypt base columnar cell
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	complementary DNA
CHO	Chinese Hamster Ovary
Clec2	C-type lectin-like 2
Clr	C-type lectin-related
Cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalovirus
COS7	CV-1 in Origin, carrying SV40
CREB	cyclic AMP-responsive element-binding protein
CTLD	C-type lectin-like domain
CTLRs	C-type lectin-like receptor
CV	Column volume

Cyto	cytoplasmatic domain
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DC	dendritic cell
Dd	didestilliert
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleotid Triphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
dsRED	Discosoma sp. red fluorescent protein
dsRNA	doppelsträngige RNA
DSS	Dextran Sulfat Sodium
DTT	Dithiotreitol
E. coli	Escherichia coli
E1a	Adenovirus early region 1A
ECL	Enhanced chemiluminescence
ECMV	Encephalomyocarditis Virus
EDTA	Ethylenditetraessigsäure
Egfp	enhanced green fluorescent protein
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
EndoH	Endoglycosidase H
EpCAM	Epithelial cell adhesion molecule
F(ab)	Fragment antigen binding
FACS	Fluorescence activated cell sorting
Fc	Fragment crystallizable
FCS	fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FLAG	Peptidsequenz DYKDDDDK
For	forward
FSC	forward scatter
G418	Geneticin
GALT	gut-associated lymphoid tissue
Gapdh	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
GS	Glycin-Serin
H	Stunde

HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HCL	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl) -1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
His	Histidin
HMW	high molecular weight
HRP	horse radish peroxidase
Hu	human
Hygro	Hygromycin
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IECs	intestinale Epithelzelle
IELs	intraepitheliale Lymphocyten
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
Ig-k	Immunglobulin kappa
IRES	interne ribosomale Eintrittsstelle
IL	Interleukin
ILCs	innate lymphoid cell
IMDM	Iscoe's Modified Dulbecco's Medium
Inp.	Input
IPS-1	interferon-beta promoter stimulator 1
IRF	Interferon-regulatorischer Faktor
ISRE	Interferon-sensitive response element
ITAM	Immunoreceptor-Tyrosine-based Activation Motif
KACL	Keratinocyte-associated C-type lectin
Kb	Kilobasen
KDa	Kilodalton
Kg	Kilogramm
KIRs	Killer Ig-like receptors
KLR	Killer cell lectin-like receptor
Klrb1	Killer Cell Lectin Like Receptor B1
KLRF2	Killer Cell Lectin Like Receptor F2
LAMP-1	lysosomal-associated membrane protein-1
LB	Luria Bertani
Lgr5	Leu-rich-repeat containing G-protein coupled receptor 5-expressing
LILRs	Leukocyte Ig-like receptors

LLT1	Lectin Like Transcript-1
Lösl.	löslich
LPLs	Lamina propria lymphocytes
LRC	Leukocyte Receptor Cluster
M	Molar
mA	Milliampere
mAk	monoklonaler Antikörper
MALT	Mucosa-associated lymphoid tissue
mAU	milli absorption unit
Max.	Maximum
MCMV	Maus Cytomegalovirus
MDA-5	melanoma differentiation associated gene 5
MFI	Median fluorescence intensity
Mg	Magnesium
MHC	Major Histocompatibility Complex
MICA	MHC class I chain-related protein A
MICB	MHC class I chain-related protein B
Min	Minute
ml	Milliliter
M-MLV	Moloney Murine Leukemia Virus
MODE-K	murine duodenal epithelial cell clone K
mRNA	messenger RNA
Myc	Peptidsequenz EQKLISEEDL
M-Zelle	microfold-Zelle
NALT	nasopharynx-associated lymphoid tissue
ND	nicht detektierbar
NFAT	Nuclear Factor of Activated T cell
Ng	Nanogramm
NK	Natürliche Killerzelle
NKC	Naturürliche Killer Genkomplex
NKG2A	Natural Killer Group 2A
NKG2D	Natural Killer Group 2D
Nkrp	NK cell receptor protein
Nm	Nanometer
NOD2	Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2
NP-40	Nonidet P40

Ns	nicht signifikant
NTA	Nitrilotriessigsäure
P	Wahrscheinlichkeit
P3X	P3x63Ag8.653
PAMPs	Pathogen associated molecular pattern
PBS	Phosphate buffered saline
PBST	Phosphate buffered saline with Tween-20
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PEG	Polyethylenglykol
Pen.	Penicillin
perCP	Peridinin-Chlorophyll-protein
PFA	Paraformaldehyd
Pg	Picogramm
PhusionHF	Phusion High-Fidelity
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
PNGaseF	Peptid: N-glycosidase F
Poly(I:C)	Polyinosin-Polycytidyl-Säure
pPCR	quantitative Polymerase Chain Reaction
Ppib	peptidylprolyl isomerase B
PRR	Pattern Recognition Receptor
PTP	Protein Tyrosin Phosphatase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PVG	Piebald Virol Glaxo
Red.	reduzierend
Rev	reverse
RIG-I	retinoic-acid-inducible protein I
RIP-1	receptor-interacting protein 1
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	rounds per minute
RPMI	Rosswell Park Memorial Institute (Medium)
rRNA	ribosomale RNA
RSV	Rous sarcoma virus
RT	Raumtemperatur
S	Sekunde
s.c.	subcutan

SA	Streptavidin
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Sec	Sekunde
SFI	spezifische Fluoreszenzintensität
SIgA	sekretorisches Immunglobulin A
SOC	Super Optimal broth with Catabolite repression
SSC	Side scatter
ST	stalk
Strep.	Straptavidin
SV40	Simian Virus 40
TA	transit amplifying
TAE	TRIS-Acetate-EDTA
Tag	„Markierung“
TBK1	TANK-binding kinase 1
TBP [^]	TATA-binding protein
TBS	Tris-buffered saline
TBST	Tris-buffered saline mit Tween20
TCR	T-Zell-Rezeptor
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TFF3	trefoil factor 3
TLA	Thymus Leukemia Antigen
TLR	Toll-like receptor
TM	Transmembrandomäne
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAF3	TNF receptor-associated factor 3
TRIF	TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN β
U	unit
ü.N.	über Nacht
μ F	Microferrat
ULBP	UL16-binding protein
UTR	untranslated region
UV	ultraviolett
V	Volt
VIS	vislble

V-J2-C	Variable-Joining2-Constant
WE	Wochenende
Weibl.	Weiblich
WT	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Der Darm

1.1.1 Aufbau des Gastrointestinaltraktes

Der Gastrointestinaltrakt beginnt mit dem Mund und endet mit dem Canalis analis (Analkanal). Im Mund wird die Verdauung der Kohlenhydrate und Fette mit den im Speichel der Ohrspeicheldrüse (Parotis) enthaltenen Enzymen Amylase und Lipase initiiert. Über den Ösophagus gelangt der Nahrungsbrei in den Magen, in dem er mit Säure und Pepsin durchmischt wird (Chymifikation), um über den Magenpförtner (Pylorus), welcher den Weitertransport des Chymus reguliert, in den Dünndarm zu gelangen (Abb. 1). Dieser ist in drei Segmente unterteilt: das Duodenum (Zwölffingerdarm), das Jejunum (Leerdarm) und das Ileum (Krummdarm).

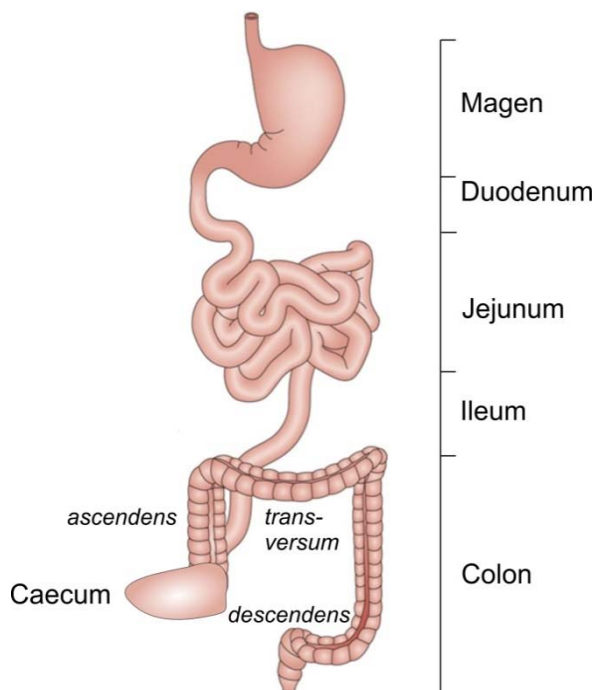


Abbildung 1: Abschnitte des Gastrointestinaltraktes. Aus dem Magen gelangt der Nahrungsbrei in das Duodenum, das der Absorption einfacher Monosaccharide und Aminosäuren dient. Verdauung und Resorption größerer Makromoleküle erfolgt in den Dünndarmabschnitten Jejunum und Ileum. Die Rückresorption von Wasser und Elektrolyten und das Zersetzen unverdaulicher Nahrungsbestandteile findet im Colon statt, welcher bis zu 10^{12} Mikroorganismen aus bis zu 500 unterschiedlichen Spezies beherbergt. Adaptiert nach Mowat & Agace, 2014.

Die Absorption einfacher Monosaccharide und leicht zugänglicher Aminosäuren erfolgt im Duodenum, in welchem der Chymus mit exokrinen Sekreten aus Pankreas und den Brunner Drüsen sowie der Gallenflüssigkeit gemischt wird und dabei Proteine, Fette und Kohlenhydrate in Monosaccharide, Aminosäuren und Fettsäuren gespalten werden. Anschließend ans Duodenum folgt das Jejunum, welches in der Maus an einem 2 cm langem Gekröse befestigt in mehreren Schlingen vor allem im ventralen Teil der Bauchhöhle liegt. Ebenso wie im Ileum, welches auch durch Peyer Plaques in der Submukosa charakterisiert ist, erfolgt hier die Verdauung und Resorption größerer Makromoleküle. Das Ileum mündet auf der Grenze zwischen dem proximalen Abschnitt des Dickdarms (ascendens) und des Caecums (Blinddarm) in den Colon (Grimmdarm) ein. Das Caecum, dessen Lage variabel ist, ist

etwa 3 cm lang und weist eine hufeisenförmige Form mit nach rechts gerichteter Öffnung auf. Hier findet die Fermentation von pflanzlichen Bestandteilen und die Produktion von Vitamin K und Vitamin B statt, Vitamine, die durch Koprophagie reabsorbiert werden (Nguyen et al., 2015). Aus dem Caecum geht der Colon ascendens hervor, schließt an den Colon transversum und den distalen Colon descendens. Zu den Hauptfunktionen des Caecums und des Colons gehört die Rückresorption von Wasser und Elektrolyten und somit die Eindickung des Darminhaltes sowie das Zersetzen unverdaulicher Nahrungsreste durch eine komplexe Bakterienflora. Angrenzend an den Colon folgt das Rektum (Mastdarm), welches mit dem Anus endet (Salomon, Gille, & Geyer, 2008) sowie (Leonhardt Taschenatlas Anatomie; Labormaus 2004).

1.1.2 Aufbau und Funktion des intestinalen Epithels

Der Dünndarm ist ein durchgehendes Rohr, das im Inneren mit einem einschichtigen hochprismatischen Säulenepithel ausgekleidet ist. Um die Resorptionsfläche zur Aufnahme von Nährstoffen größtmöglich zu gestalten, ist die Mukosa mit fingerförmigen Erhebungen, den sogenannten Zotten oder Villi (Villi intestinales) ausgestattet. Diese verlaufen an der Basis in verzweigte Drüsen-ähnliche Einstülpungen, bekannt als Lieberkühn-Krypten (Glandulae intestinales), in denen intestinale lang lebige pluripotente Stammzellen residieren (Johanna Pott & Hornef, 2012). Durch diese ist eine kontinuierliche Selbstregeneration des Epithels gewährleistet. Innerhalb des Intestinaltraktes ist von proximal nach distal eine Verkürzung der Zotten und eine Vertiefung der Lieberkühn-Krypten gegeben (Leonhardt Taschenatlas Anatomie; Labormaus 2004). Somit besitzt das Duodenum sehr dichte, hohe blattförmige Zotten und flache Krypten, diese fehlen jedoch gänzlich im Caecum und im Colon, wo eine glatte intestinale Oberfläche mit tiefsitzenden Krypten vorherrscht. Unterhalb des Epithelmantels liegt die Lamina Propria, ein lockeres Bindegewebe, welches den Villus als Gerüst stützt, eine Vielfalt an Lymphozyten beherbergt und Anbindung an das Kapillarnetz, das Nervenplexus und die submukösen Lymphbahnen bietet. In der Lamina Propria ist eine dünne glatte Muskelschicht eingebaut, Muscularis mucosae, die durch rhythmische Kontraktionen und Relaxationen der Fortbewegung des Nahrungsbreies dient. Unterhalb dieser befindet sich die Submucosa, ein Bindegewebe mit einer dickeren Muskelschicht. Die äußerste Serosa trennt den Darm vom Peritonealraum ab (Abbildung 2).

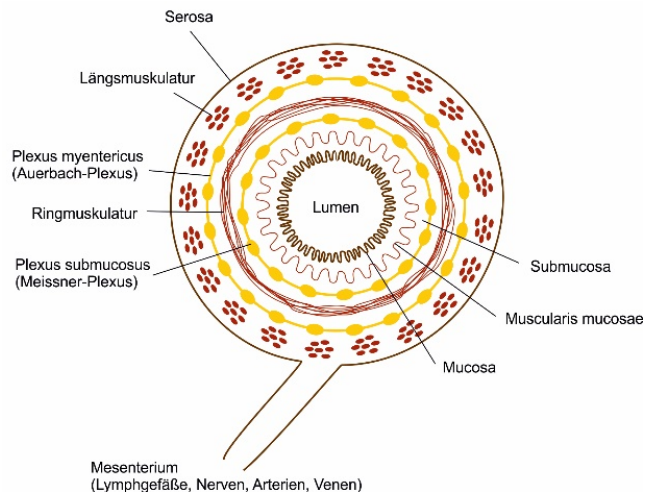


Abbildung 2: Schematischer Aufbau des Darmes. Querschnitt durch eine Darmwand. Die Serosa umhüllt den Darm und dient der Trennung zum Peritonealraum. Die darunter befindliche Rings- und Längsmuskulatur kontrolliert die Durchmischung sowie den Weitertransport des Chymus. Zwischen den glatten Muskelschichten befindet sich der Auerbach-Plexus, der die Muskulatur innerviert. Die Unterschleimschicht (Submucosa) trennt die Schleimschicht (Mucosa) von der Muskelschicht. Dieser Abschnitt, der den Auerbach-Plexus enthält, ist reich an Nerven-, Blut- und Lymphgefäßen. Die innere Schicht der Darmwand (Mucosa) bildet Darmzotten (Villi) und Einstülpungen (Krypten) aus. Die Muscularis mucosae unterhalb der Lamina Propria trennt die Mucosa von der Submucosa ab.

1.1.3 Die polarisierte Epithelzelle

Die intestinalen Epithelzellen (IECs) sind hoch polarisierte Zellen, deren Plasmamembran aus zwei funktionell und strukturell diskreten Bereichen besteht (Lodish et al., 2000). Die apikale, dem Lumen angrenzende Seite, ist insbesondere für die Aufnahme von Nährstoffen spezialisiert, während der basolaterale, der Lamina Propria zugewandte Bereich, den Transport an extrazelluläre Flüssigkeiten vermittelt und benachbarte Epithelzellen untereinander verbindet. Diese interzelluläre Verbindung wird aus drei Haupt-Verbindungskomplexen zusammengesetzt: den tight junctions (*zonula occludens*), den adherent junctions (*zonula adhaerens*) und den Desmosomen (*macula adhaerens*) (Farquhar & Palade, 1963). Die tight junctions, die durch z. B. die Transmembranproteine Occludin und Claudin ausgebildet werden, befinden sich auf der apikal-basolateralen Achse. Sie regulieren die epitheliale, parazelluläre Permeabilität und dienen als Verschluss des Interzellulärspaces, um eine Durchmischung der diversen Transportproteine und Lipide der unterschiedlichen Bereiche zu verhindern. Die darunter liegenden adherent junctions, die unter anderem E-Cadherin oder die Desmosomen bestehend aus Desmoglein und Desmocollin enthält (Garrod & Chidgey, 2007), dienen der Zell-Zell Adhäsion und tragen somit zur mechanischen Festigkeit der epithelialen Barriere bei (Neunlist et al., 2013). Des Weiteren sind sie bei der intrazellulären Signalübertragung beteiligt und sind zusammen mit den tight junctions mit dem Cytoskelett assoziiert (Madara, 1990; Perez-Moreno & Fuchs, 2006; Ulluwishewa et al., 2011).

1.1.4 Unterschiedliche Epithelzelltypen

Die epitheliale Barriere ist aus vier differenzierten hochspezialisierten Zelltypen aufgebaut, die aus pluripotenten intestinalen Stammzellen entspringen und die Funktionen des Epithels vermitteln (Abbildung 3): absorptive Zellen (Enterocyten) sowie Goblet-, Paneth- und neuroendokrine Zellen als intraepitheliale Drüsenzellen (Cheng & Leblond, 1974). Den unterschiedlichen physiologischen Funktionen entlang der cephalo-caudalen intestinalen Bereiche entsprechend, variiert die Häufigkeit dieser diversen Zelltypen. Die Enterocyten sind reichlich im Dünndarm vertreten. Ihre Aufgabe ist die Resorption der aufgenommenen Nährstoffe und die Sekretion hydrolytischer Enzyme (Barker, van de Wetering, & Clevers, 2008). Die Anzahl der mukussekretierenden Gobletzellen nimmt entlang des Gastrointestinaltraktes in Richtung des Colons zu. Sie stellen 10 % aller Epithelzellen im oberen Abschnitt des Dünndarms und ihre Häufigkeit steigt auf etwa 25 % im distalen Colon (Mowat & Agace, 2014). Enteroendokrine Zellen bilden eine sehr kleine Population (<1 %) im Epithel aus. Sie stellen jedoch die größte Population hormonproduzierender Zellen im gesamten Körper dar (Schonhoff, Giel-Moloney, & Leiter, 2004). Innerhalb des Intestinaltraktes sind viele unterschiedliche neuroendokrine Zelltypen vorzufinden, die sich durch die Produktion spezifischer Hormone, wie z. B. Somatostatin, Serotonin oder Substanz P, unterscheiden. Paneth Zellen treten nur im Dünndarm auf und sind an der untersten Position der Basis der Lieberkühn-Krypten lokalisiert. Sie kommen vor allem im Ileum konzentriert vor und sind bedeutend für die intestinale Homöostase durch die Sekretion großer Mengen von antimikrobiellen Peptiden wie Lysozymen und α -Defensinen (Cryptidine, abstammend vom engl. Crypt defensine im murinen Zellen) sowie für den Erhalt und die Regulierung der epithelialen Stamm- und Vorläuferzellen in den Krypten (Clevers & Bevins, 2013; Ouellette, Miller, Henschen, & Selsted, 1992; Porter, Bevins, Ghosh, & Ganz, 2002). Zudem existieren drei weitere intestinale Zelltypen, von denen die Funktion bislang unzureichend definiert wurde: Tuftzellen, Cupzellen sowie Peyer Plaques-assoziierte M-Zellen (M=engl. microfold) (Gerbe, Legraverend, & Jay, 2012).

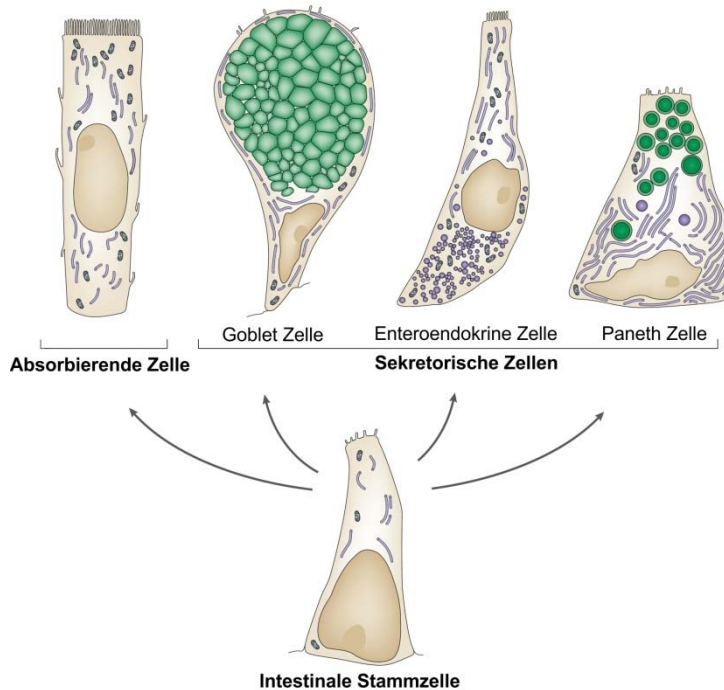


Abbildung 3: Epitheliale Zelltypen im Dünndarm von Säugetieren. Aus einer intestinalen Stammzelle entspringen vier unterschiedliche Klassen an differenzierten intestinalen Epithelzelltypen. Absorptive Zellen sind charakterisiert durch einen dichten Mikrovillisaum an der apikalen Membran. Sekretorische Zellen werden unterteilt in Goblet Zellen, enteroendokrine Zellen und Paneth Zellen. Goblet Zellen dienen der Sekretion der schützenden Mukusschicht und enthalten zahlreiche Muzin-gefüllte sekretorische Granula. Die hormonelle Regulation des Dünndarms erfolgt durch enteroendokrine Zellen. Paneth Zellen sind in der Kryptregion ausschließlich im Dünndarm lokalisiert und sekretieren antibakterielle Proteine. Adaptiert nach (Crosnier, Stamataki, & Lewis, 2006).

1.1.5 Mukusschicht an der apikalen Grenze

Die Mukusschicht, ein hochglykosyliertes polymeres Netzwerk, wird von den Gobletzellen produziert und dient als zellassoziierte Komponente der mukosalen Barriere als erste Verteidigungslinie bei einer Infektion mit Pathogenen (Peterson & Artis, 2014). Glykosylierte Mucine bestehen zu mehr als 80 % aus O- und N-verknüpften Oligosacchariden und sind aus einzelnen Mukindomänen zusammengesetzt (Hollingsworth & Swanson, 2004)(Johansson, Larsson, & Hansson, 2011). Diese Domänen enthalten einen Proteinkern, welcher aus Prolin-Threonin-Serin (PTS) Sequenzen, die oft in Reihe geschaltet als Tandem Repeats wiederholt werden, zusammengesetzt ist. Insgesamt werden zwei Klassen von Mucinen beschrieben: Transmembranmucine und sekretierte gelformende und nicht-gelformende Mucine (Hollingsworth & Swanson, 2004). Membran-assoziierte Mucine sind auf der apikalen Seite der Enterocyten zu finden, darunter die Mucine MUC3, MUC12, MUC17 und MUC13 (S. J. Williams et al., 2001)(Johansson, Sjövall, & Hansson, 2013). Der Hauptanteil der Mukusschicht im Intestinaltrakt wird aus dem gelformenden Mukin Muc2 gebildet, welches mit 2300 Aminosäuren das größte Mukin

repräsentiert (Gum, Hicks, Toribara, Siddiki, & Kim, 1994). Während der Dünndarm, das distale Ileum ausgeschlossen, mit 10^5 Bakterien pro ml eine vorwiegend sterile Umgebung aufweist, kolonisiert den Colon ein komplexeres Mikrobiom mit bis zu 10^{12} Bakterien pro ml (Mowat & Agace, 2014). Diese Verteilung spiegelt sich im Aufbau der Mukusschicht entlang der cephalo-caudalen Achse wieder. Im Gegensatz zum Dünndarm ist die aus Muc2 bestehende Mukusschicht im Colon aus zwei Schichten aufgebaut. Eine innere, dicht gepackte Schicht (in der Maus etwa 50 μm und im Menschen einige Hundert μm), die der physischen Separierung der Bakterien von den Epithelzellen dient, und eine äußere, lose ungebundene Schicht (Johansson et al., 2008; Johansson, Ambort, et al., 2011; Johansson, Larsson, et al., 2011; Snoeck, Goddeeris, & Cox, 2005). Der Oberflächenmucus im Dünndarm besitzt die Eigenschaften der zuletzt beschriebenen (Gum et al., 1994). Es ist bekannt, dass die Struktur der reifen Mukusschicht durch das intestinale Mikrobiom auf transkriptioneller Ebene reguliert werden kann (Comelli et al., 2008).

1.1.6 Intestinale Stammzellnische

Die geschützte Stammzellnische des Darmes ermöglicht eine schnelle und kontinuierlich andauernde Selbsterneuerung der intestinalen epithelialen Barriere. Die Lgr5 (engl. Leu-rich-repeat containing G-protein coupled receptor 5-expressing) positiven, als CBC (engl. Cycling crypt base columnar cell)-Zelle bezeichneten Stammzellen sind an der Basis der Lieberkühn-Krypten lokalisiert und im Dünndarm abwechselnd mit Paneth Zellen vermischt (Abbildung 4) (Barker et al., 2007). Jede Krypte enthält etwa 15 CBC-Zellen und 10 Paneth Zellen (Clevers & Bevins, 2013). Alle 24 h verdoppelt sich eine residente mitotisch aktive CBC-Zelle durch symmetrische Teilung. Anschließend migrieren ihre Nachkommen entlang der Krypt-Villi-Achse aufwärts, wo sie als reife differenzierte Epithelzellen nach 4-5 Tagen am oberen Ende der Villi ankommen und aus dem Epithelzellverbund mittels Anoikis ausgeschlossen werden (Gilmore, 2005). Dabei wird durch komplexe Remodellierungsprozesse durch Reorganisation von tight junctions die entstandene Lücke mit Nachkommen wieder aufgefüllt (Guan et al., 2011)(Madara, 1990). Im Gegensatz zu den CBC-Zellen migrieren die Paneth Zellen zum Grund der Krypten und werden alle 3-6 Wochen von bestimmten sekretorischen Vorläuferzellen erneuert (Barker, 2014). Zusätzlich zu den CBC-Zellen residieren an der vierten Position in der Krypte über der untersten Paneth Zelle „stille“ +4 Stammzellen, welche nach Schädigung des Epithels rekrutiert werden können, um die epitheliale Barriere wieder schnellstmöglich zu regenerieren (Buczacki et al., 2013)(H. Tian et al., 2011). Die Proliferation und Differenzierung der CBC-Zellen nach Teilung findet über den Paneth Zellen statt. Dabei konnte an Position +5 der Ursprung der Differenzierung festgelegt werden (Bjerknes & Cheng, 1981)(MATTHEW BJERKNES AND HAZEL CHENG, 2002). Ab dieser Position werden diese stark proliferierenden Zellen, welche über die Wnt Signalkaskade kontrolliert werden,

bis zum Austreten aus der Krypte und somit dem Proliferationsende als TA (engl. transit amplifying)-Zellen bezeichnet (Pinto & Clevers, 2005)(Kuhnert et al., 2004). Die Größe und Aktivität des Stammzellpools wird durch die Paneth Zellen reguliert, da die sich teilenden CBC-Zellen um einen für Paneth Zellen vorgegebenem Platz in der Krypte konkurrieren (Clevers & Bevins, 2013). Zudem wurde beschrieben, dass der Ernährungszustand des Organismus in Zusammenhang mit der Stammzellaktivität steht (Yilmaz et al., 2012).

Durch die Erkenntnisse in der intestinalen Stammzellforschung in den letzten Jahren ist es möglich aus einer einzelnen Lgr5+ Stammzelle „Mini-Därme“ mit nahezu physiologischen Eigenschaften in vitro zu reproduzieren (Sato et al., 2009a). Unter Zugabe von R-Spondin als Wnt-Agonisten und Lgr5 Liganden und des epithelialen Wachstumsfaktor EGF sowie aktivierender Notch Signale und der Inhibition des BMP-Proteins durch Noggin können diese ewig wachsenden epithelialen Organoide als 3-D Kultur in einem Matrigel-basierten Kultursystem kultiviert werden (Barker et al., 2007)(Carmon, Gong, Lin, Thomas, & Liu, 2011)(van Es, de Geest, van de Born, Clevers, & Hassan, 2010).

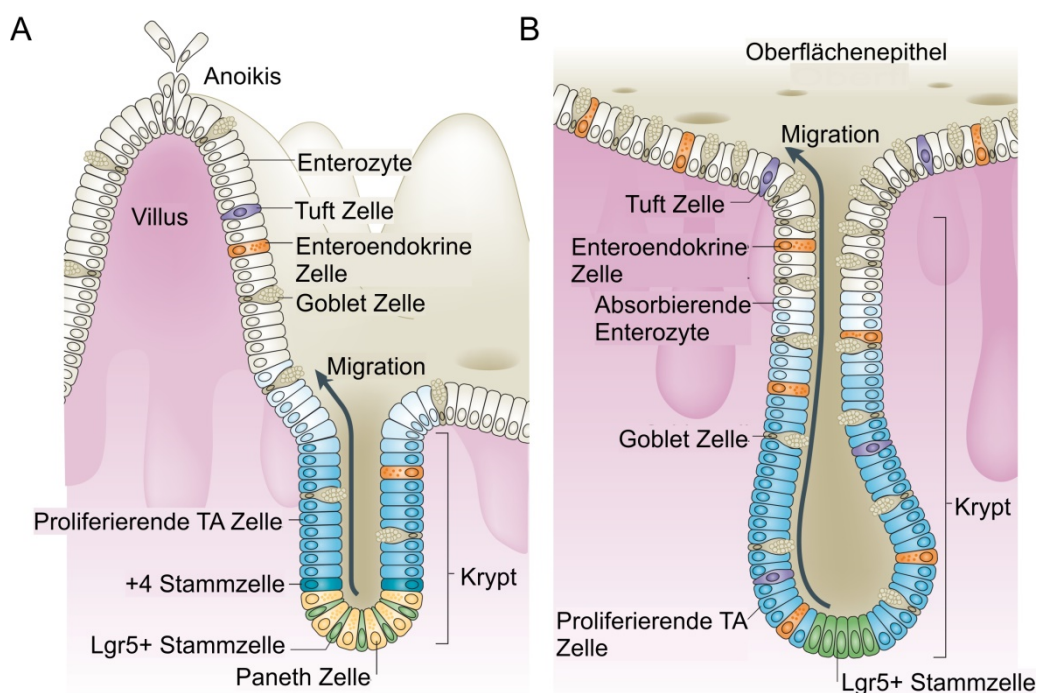


Abbildung 4: Die intestinale Stammzellnische im Dünndarm und im Colon. (A) Dünndarm (links). An der Basis der Krypten sind LGR5+ Stammzellen (CBC (engl. crypt base columnar) -Zellen) mit Paneth Zellen interkaliert, aus welchen proliferierende TA (engl. transit amplifying)-Zellen hervorgehen. TA Zellen differenzieren kontinuierlich in die verschiedenen intestinalen Epithelzelltypen (Enterozyten, Goblet Zellen und enteroendokrine Zellen) und liefern somit Nachfolger für die an der Villuspitze mittels Anoikis abgestoßenen differenzierten Epithelzellen. Bei Schädigung des Epithels können „stille“ +4 Stammzellen die Funktion der CBC-Zellen übernehmen. (B) Colon (rechts). Im Vergleich zum Dünndarm ist hier entsprechend der Funktion eine größere Anzahl an Goblet Zellen und eine verminderte Anzahl an Enterozyten vorzufinden, die aus TA-Zellen hervorgehen (Barker, 2014).

1.2 Das intestinale Immunsystem

1.2.1 Das Immunsystem des Darmes

Der Darm repräsentiert mit der höchsten Anzahl an Immunzellen das größte Immunorgan der Säugetiere (Mowat & Agace, 2014). Das mukosale Immunsystem schützt die weite Schleimhautoberfläche vor dem Eintreten fremder Pathogene, toxischer Substanzen, immunmodulatorischer Stimuli aus der Nahrung und der kommensalen Mikroorganismen aus dem Darmlumen. Basierend auf den funktionellen und anatomischen Eigenschaften wird das mukosale Immunsystem in induktive Strukturen und Effektor-Gebiete eingeteilt (McGhee & Fujihashi, 2012). Zu den induktiven Strukturen gehört das Darm assoziierte lymphatische Gewebe (engl. GALT = gut-associated lymphoid tissue). Dieser Bereich zählt neben dem Nasopharynx assoziierten lymphatischen Gewebe (engl. NALT = nasopharynx-associated lymphoid tissue) und dem Bronchus assoziiertem lymphatischen Gewebe (engl. BALT = bronchus-associated lymphoid tissue) zur Hauptgruppe der Mukosa assoziierten lymphatischen Gewebe (engl. MALT= mucosa-associated lymphoid tissue) (McGhee & Fujihashi, 2012)(Smith, MacDonald, & Blumberg, 2013). Die induktiven Bereiche des GALT werden repräsentiert durch organisierte lymphoide Aggregate, die in der Mukosa und Submukosa lokalisiert sind (Abbildung 5), wie Peyer Plaques, mesenterische Lymphknoten und isolierte lymphoide Follikel (Mowat & Agace, 2014). Peyer Plaques bestehen aus zahlreichen B-Zell Lymphoidfollikeln, die von T-Zell Arealen umgeben sind. Das Follikel-assoziierte Epithel umhüllt die Peyer Plaques und enthält spezialisierte Epithelzellen (M-Zellen), die zur Aufnahme von Antigenen und deren Transport zu Antigen-präsentierende dendritische Zellen (DCs) fungieren.

Als Effektorgebiete im intestinalen Immunsystem werden die Epithelzellschicht und die darunter liegende Lamina Propria bezeichnet. Letztere enthält eine Vielzahl an Immunzellen der angeborenen Immunität sowie B-Zellen und T-Zellen.

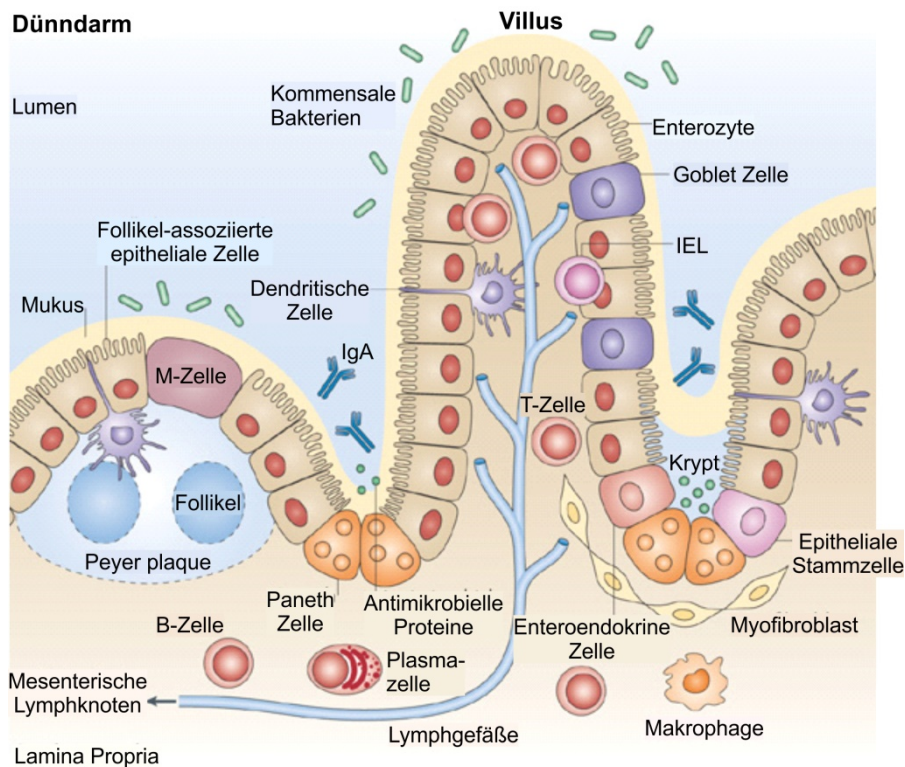


Abbildung 5: Induktive Strukturen und Effektorbereiche des mukosalen Immunsystems. Die epitheliale Zellschicht dient mit unterschiedlichen sekretorischen Zellen als primäre „Verteidigungslinie“. Die Lamina Propria enthält als weiteres Effektorgebiet eine Vielzahl an Immunzellen, darunter IgA produzierende Plasmazellen, T-Zellen, Makrophagen und dendritische Zellen. Induktive Strukturen werden als GALT (engl. gut-associated lymphoid tissue) zusammengefasst und durch Peyer Plaques, mesenterische Lymphknoten und isolierte lymphoide Follikel repräsentiert (Abreu, 2010).

1.2.2 Epithelzellen als zentrale Regulatoren der Immunantwort

Intestinale Epithelzellen (IECs) sind zentrale Regulatoren bei der Bildung und Erhaltung einer physischen und biochemischen Barriere und bei der Koordination fundamentaler immunologischer Prozesse (Peterson & Artis, 2014). Diese Aufgabe wird zum einen durch die Vielzahl der unterschiedlichen spezialisierten sekretorischen Epithelzelltypen bewerkstelligt (Abb. 3, 5). Antimikrobielle Produkte (AMPs) wie REGIII β (REGIII γ in Mäusen) produziert von Paneth Zellen, hochglykosylierte Mucine (Muc2) oder regulatorische Faktoren wie TFF3 (trefoil factor 3) sekretiert von Goblet Zellen und diverse Hormone von enteroendokrinen Zellen liefern Schutz vor Pathogenen (Bevins & Salzman, 2011). Zum anderen ermöglicht die Fähigkeit der Epithelzellen des Einsammelns luminaler Komponenten und der Erkennung von Pathogenen (Abschnitt 1.2.5) eine gezielte Regulierung intestinaler Immunzellen. Epithelzellen sind in der Lage mit intraepithelialen Lymphozyten (IELs, Abschnitt 1.2.3) über die Bindung von E-Cadherin an das Lymphozyten Integrin alpha E (CD103) beta 7 (E β 7) direkt zu interagieren (Schön et al., 1999) (Abbildung 6).

In Mäusen konnte zudem gezeigt werden, dass die Interaktion des MHC-Klasse-I Moleküls Thymus Leukemia Antigen (TLA), das konstitutiv auf Epithelzellen exprimiert wird, mit CD8 α auf aktivierten CD8 α ⁺ T-Zellen in der Selektion und Akkumulierung einer hoch Antigen-sensitiven CD8 T-Zellpopulation resultiert (Huang et al., 2011). Des Weiteren sind IECs unter anderem an der Reifung naiver B-Zellen durch Priming von DCs, an der Entwicklung von Makrophagen und DCs mit tolerogenen Eigenschaften, Differenzierung von regulatorischen T-Zellen sowie an der Regulierung von angeborenen lymphoiden Zellen, den ILCs (engl. Innate lymphoid cells) beteiligt (Peterson & Artis, 2014).

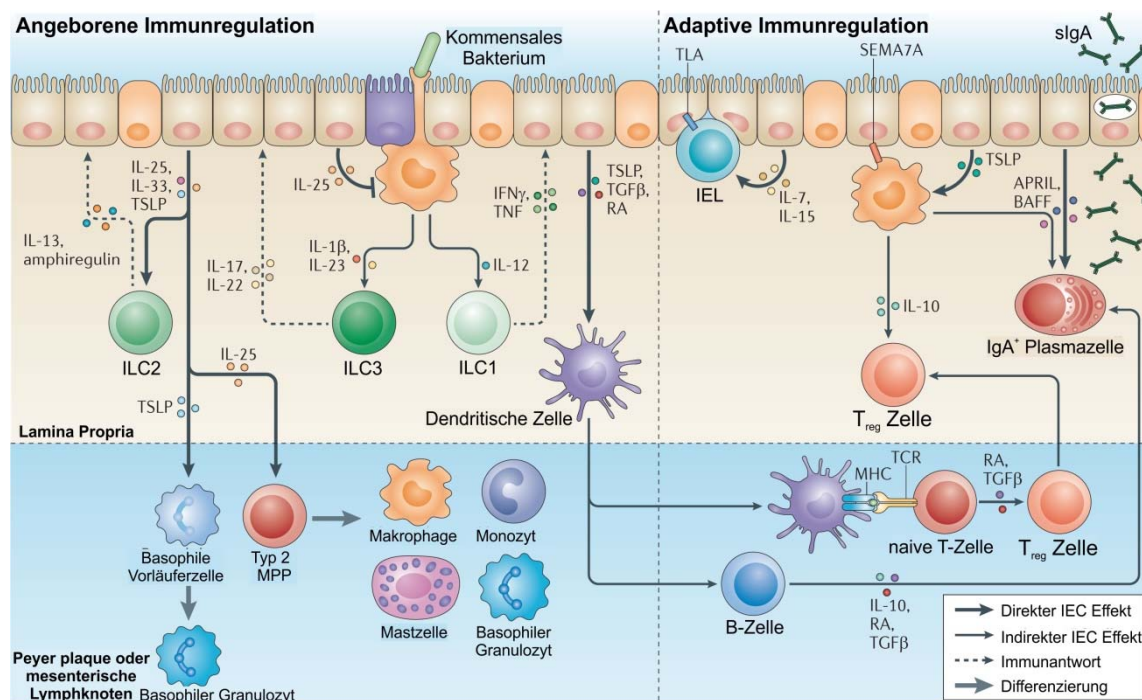


Abbildung 6: Intestinale Epithelzellen regulieren die angeborene und adaptive Immunität des Darmes. Die Erhaltung der intestinalen Homöostase und die Abwehr von invadierenden Pathogenen wird durch eine Vielzahl an intestinalen Immunzellen reguliert, die direkt oder indirekt über IECs gesteuert werden. Durch die Produktion diverser Cytokine konditionieren Epithelzellen dendritische Zellen und Makrophagen, welche die Differenzierung naiver CD4⁺ T-Zellen in regulatorische T-Zellen und deren Expansion fördern. Ebenso wird die Reifung von B-Zellen in IgA sekretierende Plasmazellen induziert. Die Regulation der angeborenen Immunität umfasst die Cytokin-vermittelte Stimulierung oder Suppression von angeborenen lymphoiden Zellen (engl. innate lymphoid cells) sowie die Expansion und Differenzierung von basophilen Vorläuferzellen (Peterson & Artis, 2014).

1.2.3 Intraepitheliale Lymphozyten (IELs)

An der Basalmembran der Enterozyten sind in den interstitiellen Räumen zahlreiche T Zellen lokalisiert, die als intraepitheliale Lymphozyten (IELs) bezeichnet werden. In Mäusen wird die stark heterogene IEL Population abhängig von der T-Zellrezeptorzusammensetzung in zwei Gruppen unterteilt: die konventionellen IELs, auch bekannt als „induzierte“ IELs, und die unkonventionellen oder „natürlichen“

IELs (Guy-Grand et al., 1991). Induzierte IELs exprimieren einen $\alpha\beta$ T-Zell Rezeptor sowie CD8 $\alpha\beta$ oder CD4. Natürliche IELs hingegen exprimieren vorwiegend ein CD8 $\alpha\alpha$ Homodimer zusammen mit einem $\alpha\beta$ oder einem $\gamma\delta$ T-Zell Rezeptor (Mowat & Agace, 2014). Natürliche IELs erhalten ihren aktivierten Phänotyp während der Entwicklung im Thymus, wohingegen induzierte IELs Nachkommen konventioneller T-Zellen sind, die in mesenterischen Lymphknoten oder den Peyer'schen Plaques nach Präsentation peripherer Antigene reifen (Cheroutre, Lambolez, & Mucida, 2011). Im Vergleich zum adulten menschlichen Dünndarm, in dem vorwiegend induzierte IELs vorzufinden sind, ist in Mäusen die natürliche IEL Population die dominierende T-Zell Population. Die Verteilung der T-Zellsubtypen variiert abhängig von der anatomischen Lokalisation, vom Alter, Stamm, der mikrobiellen Flora und den Haltungsbedingungen (Sheridan & Lefrançois, 2010). Mit bis zu 60% repräsentieren die $\gamma\delta$ TCR⁺ Lymphozyten im Dünndarm den größten Anteil in Mäusen (Cheroutre et al., 2011). Die Mehrheit der IELs sind cytotoxisch aktiv, exprimieren Effektorzytokine wie IFN γ , IL-2 oder IL-17 und sind sowohl an der Regulierung anti-inflammatorischer als auch inflammatorischer Prozesse in der intestinalen Umgebung beteiligt (Cheroutre et al., 2011).

1.2.4 Mukosale IgA Sekretion

Ein weiterer wichtiger Mechanismus des GALT zur Unterscheidung zwischen harmlosen kommensalen Bakterien und lebensbedrohlichen Pathogenen ist die mukosale IgA Sekretion. Polymeres IgA wird von den Plasmazellen in der Lamina Propria gebildet und mittels des Poly-Immunglobulin-Rezeptors durch Transzytose durch die Epithelzellschicht ins Darmlumen sekretiert (Corthésy, 2013). Im Unterschied zum monomeren IgA Antikörper im Serum besitzt sekretorisches IgA (sIgA) zusätzlich eine Joining (J)-Kette und ein sekretorisches Polypeptid (Brandtzaeg & Prydz, 1984). Mukosales IgA ist im Darm an der Neutralisierung von Antigenen und toxischen Substanzen und dem Abfangen von intrazellulären Pathogenen beteiligt (Smith et al., 2013)(Corthésy, 2013). Auch polymeres IgM sowie IgG sind an der Immunüberwachung des Gastrointestinaltraktes beteiligt.

1.2.5 Erkennung von Pathogenen

Die intestinalen Epithelzellen sind als dynamische Wachtposten des Immunsystems an der Erkennung von bakteriellen, parasitären, viralen oder körpereigenen Komponenten beteiligt (Johanna Pott & Hornef, 2012). Die Expression von sogenannten Mustererkennungsrezeptoren (engl. PRR = Pattern Recognition Receptor) auf der Epithelzelloberfläche oder in Endosomen ermöglicht durch Induktion intrinsischer Signalwege eine aktive Steuerung der mukosalen Immunantwort. Die am besten erforschten Mitglieder gehören der Familie der Toll-ähnlichen Rezeptoren (engl. TLR = Toll-like

receptor) an (Abreu, 2010). Nach Einleitung der TLR-Signalwege werden zwei wichtige Familien von Transkriptionsfaktoren aktiviert, die Familie der nukleären Faktoren- κ B (NF- κ B) und die Interferon-regulatorischen Faktoren (IRFs). Ebenso sind CREB (engl. cyclic AMP-responsive element-binding protein) und AP1 (engl. activator protein 1) als Transkriptionsfaktoren von Bedeutung (O'Neill, Golenbock, & Bowie, 2013). Weitere Familien bilden die zytosolischen NOD-ähnlichen Rezeptoren mit den Mitgliedern NOD1 und NOD2 und die RIG-I-ähnlichen Rezeptoren (Claes, Zhou, & Philpott, 2015)(Dixit & Kagan, 2013). Mitglieder der TLR-Familie (TLR2, TLR3, TLR4, TLR5 und TLR9) können in murinem Dünndarmgewebe nachgewiesen werden (Johanna Pott & Hornef, 2012). Studien mit TLR-defizienten Mäusen konnten in einem DSS-basierten Colitis Modell zeigen, dass die mikrobielle Erkennung zum Schutz gegen intestinale Entzündungen, zur Reparatur epithelialer Schäden und zur Regulierung der Homöostase im Darm dient (Abreu, 2010)(Rakoff-Nahoum, Paglino, Eslami-Varzaneh, Edberg, & Medzhitov, 2004). Neben den schützenden Wirkungen sind die Mustererkennungsrezeptoren jedoch ebenso bei inflammatorischen Regulationsprozessen involviert. So fördert insbesondere TLR4 die Entwicklung von Colitis-assoziierten kolorektalen Tumoren und NOD2 ist ein Genlocus, welcher in Zusammenhang mit Morbus Crohn gebracht wird (Fukata et al., 2007; Hugot et al., 2001; Ogura et al., 2001).

1.2.6 Die Wirkung von Polyinosin-Polycytidyl-Säure (Poly (I:C)) auf den Darm

Verschiedene virale strukturelle Komponenten wie virale DNA, doppel- oder einzelsträngige RNA und Glykoproteine auf der Oberfläche werden als Virus-assoziiertes molekulares Muster (PAMPs = Pathogen Associated Molecular Patterns) durch TLRs und andere Mustererkennungsrezeptoren erkannt (Akira, Uematsu, & Takeuchi, 2006). Poly(I:C) ist ein synthetisches Analog zu viraler dsRNA und wird durch TLR3 (CD283) detektiert (Alexopoulou, Holt, Medzhitov, & Flavell, 2001). Neben der spezifischen Expression in konventionellen dendritischen Zellen wird TLR3 von diversen epithelialen Geweben, wie dem Atemwegs-, dem Gebärmutter-, dem Hornhaut-, dem Gallen- und ebenso dem Epithel des Intestinaltraktes exprimiert. Ebenso wird eine starke Expression im Gehirn beschrieben, besonders auf Astrocyten und Glioblastomen (Cameron et al., 2007; Lathia et al., 2008; Vontell et al., 2013). TLR3 ist ein Mitglied der Untergruppe der Nukleinsäure-detektierenden TLR-Mitglieder TLR 7, TLR 8, TLR 9 und TLR 13 und ist entweder auf der Zelloberfläche oder in endosomalen Membranen lokalisiert (Castaño-Rodríguez, Kaakoush, & Mitchell, 2014)(Abreu, 2010). In Säugetieren existieren dreizehn TLRs. TLR1-9 werden im Menschen und in der Maus exprimiert, TLR10-13 Expression findet nur in der Maus statt (Trudler, Farfara, & Frenkel, 2010). In konventionellen dendritischen Zellen induzieren virale Partikel zwei Signalwege, den TLR3/TRIF (engl. TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN β)-abhängigen und den RIG-I-abhängigen Signalweg (Akira et al., 2006). Der TRIF-

abhängige Signalweg resultiert in der Ausschüttung proinflammatorischer Cytokine, Chemokine und der Produktion der Typ I Interferone IFN α und IFN β . Die Bindung des Liganden nach Internalisierung führt zur Dimerisierung von TLR3, wodurch eine Konformationsänderung eingeleitet wird, welche TRIF rekrutiert. Die Interaktion von TRIF mit TNF receptor-associated factor 3 (TRAF3) und der Kinase receptor-interacting protein 1 (RIP-1) leitet zwei unterschiedliche Signalwege ein. Zum einen aktiviert TRAF3 die Kinasen TRAF family-member-associated NF- κ B activator (TANK)-binding kinase 1 (TBK1) und IKK-i, wodurch diese direkt IRF3 und IRF7 phosphorylieren (McWhirter et al., 2004; Sharma et al., 2003). Zum anderen aktiviert RIP1 NF- κ B (Meylan et al., 2004). Bildung von IRF3/IRF7 Homodimeren nach Phosphorylierung führt zur Translokation dieser in den Nukleus und Bindung an ISRE (engl. Interferon Stimulated Response Element) Promotorelemente, was in der Expression von Typ I Interferonen resultiert. Die Detektion von dsRNA im Cytoplasma erfolgt über den cytoplasmatischen Sensor RIG-I (engl. Retinoic-acid-inducible protein I) oder dem homologen Protein MDA-5 (engl. Melanoma differentiation associated gene 5) (Kang et al., 2002; Yoneyama et al., 2004). Nach Bindung des Adapterproteins IPS-1 (auch bekannt als MAVS, Cardif oder VISA), welches in der Membran von Mitochondrien lokalisiert ist, an RIG-I/MDA-5 über die CARD Domäne, verläuft der Signalweg ebenso wie beim TLR3/TRIF-Signalweg über die Aktivierung von TBK1 und IKK-i.

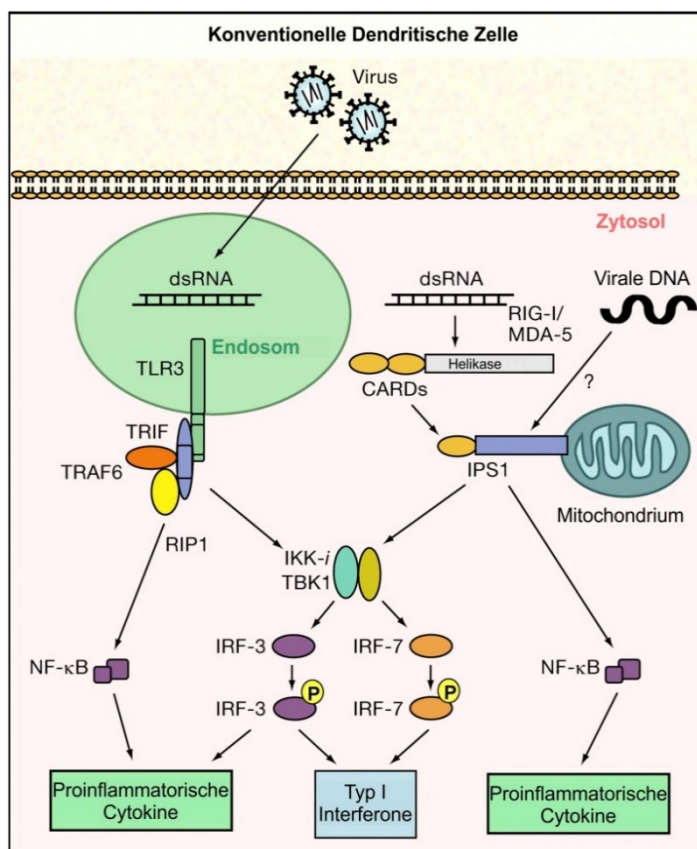


Abbildung 7: Signalkaskaden nach viraler Detektion in konventionellen DCs. Die Detektion viraler Pathogene erfolgt über zwei Signalkaskaden, die beide in der Produktion von proinflammatorischen Cytokinen und Typ I Interferonen resultieren. Die Erkennung von dsRNA durch den endosomal lokalisierten Mustererkennungsrezeptor TLR3 induziert zum einen einen

RIP1/TRAF6-NF- κ B und zum anderen einen TBK1/IKK-i-IRF-3/IRF-7 Signalweg. Detektion über den cytoplasmatischen Sensor RIG-I oder MDA-5 resultiert in der Aktivierung von IPS-1 (MAVS oder VISA) und anschließend der Kinasen TBK1/IKK-i, die zur Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren IRF3 und IRF-7 führen (Akira et al., 2006).

TLR3 wird in murinen und humanen Epithelzellen exprimiert (Cario & Podolsky, 2000; Johanna Pott & Hornef, 2012). Die Arbeitsgruppe um Tian konnte mithilfe von TLR3-defizienten Mäusen zeigen, dass Poly(I:C) und virale gereinigte doppelsträngige RNA schwerwiegende mukosale Schäden induzieren und diese Auswirkungen direkt TLR3 abhängig sind (Zhou, Wei, Sun, & Tian, 2007). Die mukosale Signalkaskade, welche durch Poly(I:C) zur Zerstörung der Epithelzellen führt, wurde in vivo in der Arbeitsgruppe um Kagnoff genauer untersucht (McAllister et al., 2013). Die intraperitoneale Verabreichung von Poly(I:C) resultiert in einer drastischen Verkürzung der Villi aufgrund der Apoptose der Epithelzellen in der mittleren bis oberen Region der Villi. Die Kryptregion hingegen war von der Apoptose nicht betroffen, sodass die Proliferationsfähigkeit der Krypten bestehen blieb (McAllister et al., 2013). Studien in TLR3- und TRIF-defizienten Mäusen zeigten, dass die Apoptose über die TLR3/TRIF-Signalkaskade in Zellen nicht hämatopoetischen Ursprungs induziert wurde. Eine Typ I Interferon- oder IRF3-vermittelte Signalübertragung konnte ausgeschlossen werden. Die Aktivierung von NF- κ B durch RIP-1 war für den Schutz der Kryptzellapoptose verantwortlich. Es ist bekannt, dass TRIF Apoptose durch Caspase 8 aktiviert (Estornes et al., 2012). Für die Apoptose der Epithelzellen und die Bewahrung des Epithels war Caspase 8 unabdingbar, da das Fehlen der letzteren in Epithelzellen nach Poly(I:C) Gabe zur Zerstörung der Villi und zum Tod der Mäuse führte (McAllister et al., 2013).

1.3 C-Typ Lektin-ähnliche Rezeptoren

1.3.1 Eigenschaften und Struktur von C-Typ Lektin-ähnlichen Rezeptoren

C-Typ Lektin-ähnliche Rezeptoren (engl. C-type lectin-like receptors (CTLRs)) repräsentieren glykosylierte Transmembranproteine mit einer Typ II Topologie. Diese sind zusammengesetzt aus einer aminoterminalen cytoplasmatischen Domäne gefolgt von einer Transmembrandomäne und einer extrazellulären Stielregion (engl. stalk) variabler Länge, die als flexibler Linker zur am C-Terminus lokalisierten C-Typ Lektin-ähnlichen Domäne (CTLD) grenzt (Abbildung 8A) (Iizuka, Naidenko, Plougastel, Fremont, & Yokoyama, 2003; Wayne M Yokoyama & Plougastel, 2003; Zelensky & Gready, 2005). Im Genom werden diese Bereiche in der Regel auf fünf oder sechs Exons kodiert (Kirkham & Carlyle, 2014). Funktionelle Proteine existieren als Homo- oder Heterodimere, die über hoch konservierte, intermolekulare Disulfidbrücken innerhalb der Stalk-Region verknüpft sind. Die charakteristische Faltung einer CTLD ist repräsentativ in Abb. 8B anhand der Struktur des murinen C-Typ Lektin-ähnlichen Moleküls Clr-g dargestellt (Skalova et al., 2012). Typischerweise wird eine

doppelte Schleifenstruktur (loop-in-loop) gebildet, bestehend aus zwei α -Helices und zwei antiparallelen β -Faltblättern. Dabei besteht jedes β -Faltblatt aus drei β -Strängen. Die gesamte Domäne bildet eine Schleife mit den beiden β -Strängen am C- und N-Terminus ($\beta 1$ und $\beta 5$), die sich annähern um eine antiparalleles β -Faltblatt zu formen. Die zweite Schleife, genannt long-loop-region, liegt innerhalb der Kerndomäne und beginnt und endet etwa an der gleichen Stelle.

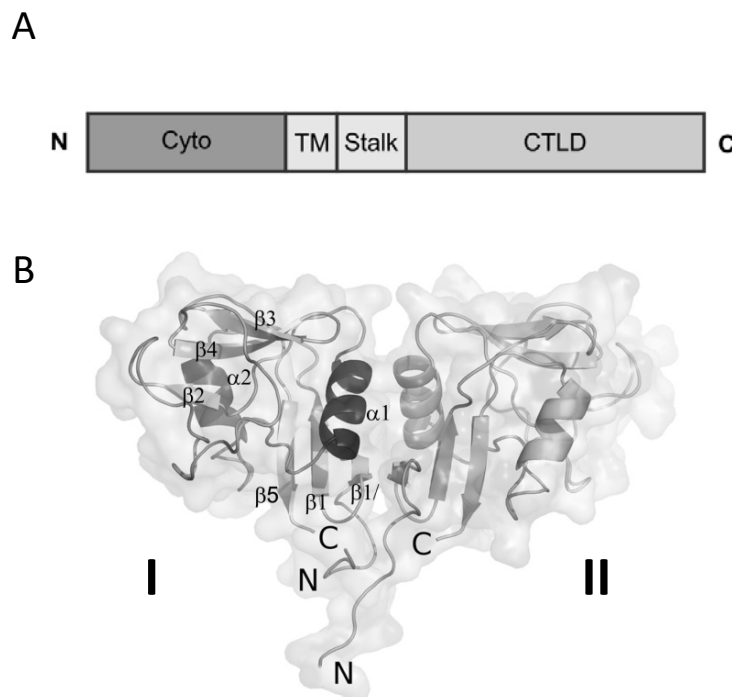


Abbildung 8: Aufbau und Struktur von C-Typ Lektin-ähnlichen Rezeptoren. (A) Dargestellt ist die aminoterminal cytoplasmatische Domäne (Cyto), gefolgt von der Transmembrandomäne (TM), der extrazellulären flexiblen Stielregion (Stalk) und der carboxyterminalen C-Typ Lektin-ähnlichen Domäne (CTLD). (B) Dimere Struktur der C-Typ Lektin-ähnlichen Domänen (I und II) des murinen Protein Clr-g. Dargestellt ist die Sekundärstruktur, die eine doppelte Schleifenstruktur mit zwei α -Helices und zwei anti-parallelen β -Faltblättern aufzeigt. Modifiziert nach Skálová et al., 2012 sowie Zelensky und Gready, 2003 (Skalova et al., 2012; Zelensky & Gready, 2005).

Vier konservierte Cysteineinheiten stabilisieren die CTLD über intramolekulare kovalente Disulfidbrücken an der Basis der Schleifen. C1 und C4 verbinden $\beta 5$ und $\alpha 1$ und C2 und C3 verbinden $\beta 3$ und $\beta 5$. Der Rest der Kette bildet zwei flankierende α -Helices aus ($\alpha 1$ und $\alpha 2$) und das zweite β -Faltblatt ($\beta 2$, $\beta 3$ und $\beta 4$) (Zelensky & Gready, 2005). Die Dimerbildung von Clr-g ist der Struktur des dimeren humanen CD69 Moleküls sehr ähnlich (Llera, Viedma, Sánchez-Madrid, & Tormo, 2001; Natarajan, Sawicki, Margulies, & Mariuzza, 2000; Skalova et al., 2012). Neben der typischen Faltung sind für die CTLD vier hydrophobe Aminosäuren innerhalb des zentralen $\beta 2$ -Stranges („WIGL“-Motif) charakteristisch. Dieser hoch konservierte Sequenzabschnitt formt den Kern der CTLD. Im Gegensatz zur Familie der C-Typ Lektine, dessen funktionelle CTLD zur Ca^{2+} -abhängigen Bindung von

Kohlenhydrate fungiert, fehlen bei den C-Typ Lektin-ähnlichen Molekülen die vier zur Ca^{2+} -Bindung notwendigen Bindestellen komplett (Weis & Drickamer, 1996). Diese atypischen C-Typ Lektine besitzen somit nicht mehr die Fähigkeit Kohlenhydrate zu binden, sondern interagieren mit Proteinen als primäre Liganden (Wayne M Yokoyama & Plougastel, 2003; Zelensky & Gready, 2005). Aufgrund der Domänenarchitektur klassifizierte Drickamer die C-Typ Lektine in 14 verschiedene Subfamilien (Zelensky & Gready, 2005). Die nicht Ca^{2+} -bindenden Typ II Transmembran CTLDs gehören der Gruppe V an, welche die im Natürlichen Killer Genkomplex (engl. Natural Killer Gene Complex (NKC)) codierten NK-Zell Rezeptoren umfasst.

1.3.2 Der Natürliche Killer Genkomplex

Im Jahre 1990 beschrieben Yokoyama und Shevach den Natürlichen Killer Gen Komplex (NKC) in der Maus als sie die Gene zweier NK-Zell Rezeptoren, Nkrp1 und Ly49, genetisch zuordnen wollten (Abb. 9) (W M Yokoyama, Kehn, Cohen, & Shevach, 1990). Seitdem stellte sich heraus, dass der NKC eine hohe Komplexität und Diversität in Bezug auf Gene und Regionen aufweist. Die Genloci sind innerhalb verschiedener Spezies hoch konserviert, was die Genorientierung, Anordnung, Position, Struktur und Sequenzhomologie betrifft (Brown & Scalzo, n.d.; Hao, Klein, & Nei, 2006; Wayne M Yokoyama & Plougastel, 2003). Im Menschen ist der NKC auf Chromosom 12 lokalisiert, in der Ratte auf Chromosom 4 und in der Maus auf Chromosom 6. Die im NKC vorhandenen Gencluster sind hoch polymorph und kodieren für eine Reihe von aktivierenden und inhibierenden NK-Zell Rezeptoren, die der Superfamilie der C-Typ Lektin-ähnlichen Rezeptoren angehören. Hierzu zählen die Untergruppen der Nkrp1, Ly49, CD94/NKG2D und CLEC2 (engl. C-type lectin-like 2) Familien (Kelley, Walter, & Trowsdale, 2005; Kirkham & Carlyle, 2014; Wayne M Yokoyama & Plougastel, 2003). Neben dem NKC existiert ein weiterer Bereich im Genom der Säugetiere, der Leukozyten-Rezeptor-Bereich (LRC = Leukocyte Receptor Cluster), der die NK-Zell Rezeptorfamilien KIRs (Killer Ig-like receptors) und LILRs (Leukocyte Ig-like receptors) innerhalb der Superfamilie der Immunglobulin-ähnlichen Rezeptoren kodiert (Kelley et al., 2005).

1.3.3 NKC-kodierte Clr Moleküle und Nkrp1 Rezeptoren

Der NKC umfasst orthologe Gene sowohl im Menschen als auch in der Maus (Abb. 9) (W M Yokoyama & Seaman, 1993; Wayne M Yokoyama & Plougastel, 2003). Diese Gene werden weiter kategorisiert in die Gruppen der Killer-Zell Lektin-ähnlichen Rezeptoren (KLRs), die vorwiegend von NK-Zellen und T-Zellen exprimiert werden, und Mitglieder der CLEC2 Familie, die ein breiteres Expressionsmuster aufweisen. In der Maus sind im NKC insgesamt zehn Vertreter der CLEC2 Familie (Clec2d-Clec2k)

zwischen den Genen *Klrb1a* (*Nkrp1a*) und *CD69* (*CD69*) lokalisiert. Diese kodieren sieben potenziell funktionelle Proteine, die als C-Typ Lektin-ähnliche (engl. Clr = C-type lectin related) Moleküle bekannt sind, darunter Clr-a (kodiert durch *Clec2e*), Clr-b (*Clecd*), Clr-c (*Clec2f*), Clr-d (*Clec2g*), Clr-f (*Clec2h*) und Clr-g (*Clec2i*) (Carlyle et al., 2008; Kirkham & Carlyle, 2014; B. Plougastel, Dubbelde, & Yokoyama, 2001). Clr-e ist ein Pseudogen und der funktionelle Status von Clr-h (*Clec2j*) und Clr-i (kein offizieller Genname) sind unbekannt (Qiang Zhang et al., 2012). Clr-h kodiert sehr wahrscheinlich für ein Protein im B6 (Qiang Zhang et al., 2012).

Strukturell zeichnet sich die CLEC2 Familie durch ein „FLkRy“ Motif in der α 2-Helix und eine kurze L3 Schleife vor dem β 3 Strang aus. Zudem fehlen in der CTLD häufig die Cysteine C4 und C5 (Vogler & Steinle, 2011).

Die Besonderheit des NKC liegt in der genetischen Verknüpfung von bestimmten Rezeptor-Liganden-Paaren, die durch Repräsentanten der *Nkrp1* und der CLEC2 Familie gestellt werden (Iizuka et al., 2003). Von besonderer Bedeutung ist die Kreuzreaktivität der murinen *Nkrp1* Rezeptoren mit den Clr Molekülen als Liganden, die nicht im humanen System vorkommt. So bindet *Nkrp1f* an Clr-c,-d,-g und *Nkrp1g* an Clr-d,-f,-g (Chen et al., 2011; Kveberg et al., 2011). Die Rezeptor- Ligandenpaare der *Nkrp1*-CLEC2 Familien in der Maus sind in Tabelle 1 aufgezeigt.

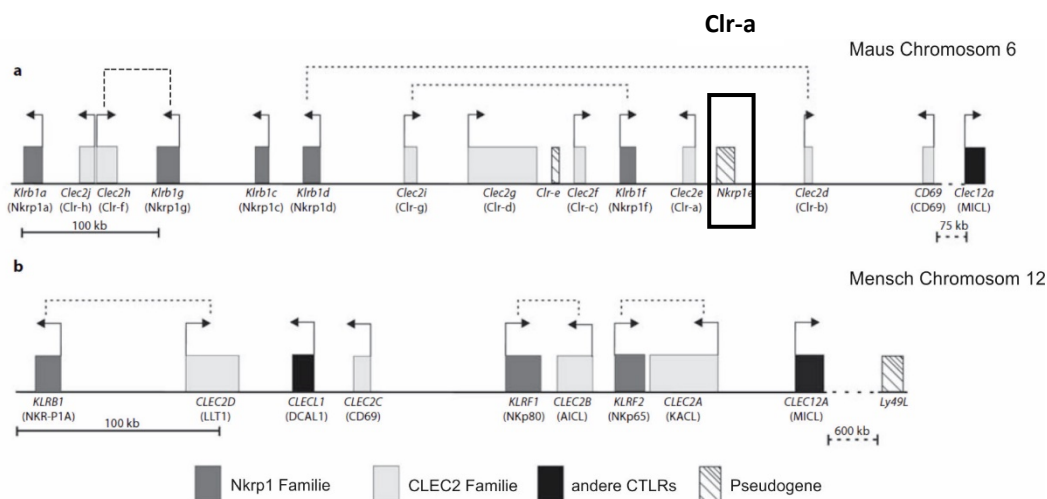


Abbildung 9: Der Natürliche Killer Gen Komplex (NKC) in Mensch und Maus. Schematische Darstellung der *Klrb1* (*Nkrp1*) und der CLEC2 (*Clr*) Genfamilien innerhalb der Superfamilie der C-Typ Lektin-ähnlichen Rezeptoren. Die transkriptionelle Orientierung ist mit Pfeilen dargestellt und bestimmte genetisch verknüpfte Rezeptor-Liganden Paare mit einer gestrichelten Linie gekennzeichnet. Die erst kürzlich entdeckten Gene *Clr-i* und *Clr-j* innerhalb der CLEC2-Familie (Kirkham & Carlyle, 2014) sind in diesem Schema nicht aufgezeigt. Modifiziert nach Vogler und Steinle, 2011 (Vogler & Steinle, 2011).

Humane Vertreter der CLEC2 Familie liefern ebenso Liganden für bestimmte NK-Zell Rezeptoren, die im NKC benachbart kodiert sind (Abb. 9, Tabelle 2). So binden KACL (CLEC2A) (aus dem engl.:

Keratinozyten-assoziiertes C-Typ Lektin), AICL (CLEC2B, aus dem engl.: Aktivierungs-induziertes C-Typ Lektin) und LLT1 (CLEC2D, aus dem engl.: Lektin-ähnliches Transkript 1) jeweils an die NK-Zell Rezeptoren NKp80 (KLRF1) (Bartel, Bauer, & Steinle, 2013; Klimosch, Bartel, Wiemann, & Steinle, 2013; Welte, Kuttruff, Waldhauer, & Steinle, 2006), NKp65 (KLRF2) (Bauer, Spreu, Rohe, Vogler, & Steinle, 2015; Spreu et al., 2010) und NKR-P1A (CD161 (KLRB1)) (David B. Rosen, Jayaram Bettadapura, Mohammed Alsharifi, Porunelloor A. Mathew, 2005; Hatice Aldemir, Virginie Prod'homme & Dumaaurier, Christelle Retiere, Gwenola Poupon, Julie Cazareth, 2005; Rosen et al., 2008). Andere Mitglieder der KLR Rezeptorfamilie, darunter murine Ly49 Rezeptoren und der aktivierende NK-Zell Rezeptor NKG2D, erzielen ihre Funktion durch Bindung an Glykoproteine mit einer MHC-Klasse-I ähnlichen Struktur, darunter klassische und nicht klassische MHC-Klasse-I Varianten sowie MHC-Klasse-I ähnliche Moleküle (Orr & Lanier, 2011).

Tabelle 1: Humane NKRP-1-CLEC2 Interaktionspaare im Natürlichen Killer Genkomplex

Rezeptor (Genbez.)	Ligand (Genbez.)	Referenzen
NKp65 (KLRF2)	KACL (CLEC2A)	(Bauer et al., 2015; Spreu et al., 2010)
NKp80 (KLRF1)	AICL (CLEC2B)	(Klimosch et al., 2013; Welte et al., 2006)
NKRP-1A (KLRB1)	LLT1 (CLEC2D)	(David B. Rosen, Jayaram Bettadapura, Mohammed Alsharifi, Porunelloor A. Mathew, 2005; Hatice Aldemir, Virginie Prod'homme & Dumaaurier, Christelle Retiere, Gwenola Poupon, Julie Cazareth, 2005; Rosen et al., 2008)

Tabelle 2: Murine Nkrp-1-CLEC2 Interaktionspaare im Natürlichen Killer Genkomplex

Rezeptor (Genbez.)	Ligand (Genbez.)	Referenzen
Nkrp1a (Klrb1a)	Clr nicht bekannt MCMV m12	(Aguilar et al., 2017)
Nkrp1c (Klrb1c)	Clr nicht bekannt MCMC m12	(Aguilar et al., 2017)
Nkrp1b/d (Klrb1b/d)	Clr-b (Clec2d), MCMV m12	(Aguilar et al., 2017; Carlyle et al., 2004)
Nkrp1f (Klrb1f)	Clr-c (Clec2f) Clr-d (Clec2g) Clr-g (Clec2i)	(Iizuka et al., 2003; Kveberg et al., 2011)

Rezeptor (Genbez.)	Ligand (Genbez.)	Referenzen
Nkrp1g (Klrb1g)	Clr-d (Clec2g) Clr-f (<i>Clec2h</i>) Clr-g (Clec2i)	Iizuka et al. 2003, Kveberg et al., 2011, Leibelt et al., 2015 (Iizuka et al., 2003; Kveberg et al., 2011; Leibelt et al., 2014)

Die erste Struktur eines NKR-P1-CLEC2 Interaktionskomplexes wurde für NKp65 und KACL beschrieben (Y. Li, Wang, Chen, Brown, & Mariuzza, 2013) und ist aufgrund der hohen Sequenzverwandtschaft repräsentativ für alle genetisch verknüpften NKR-P1-CLEC2 Paare. Die bivalente Interaktion eines KACL Homodimers mit zwei NKp65 Molekülen zeigt eine symmetrische schmetterlingsähnliche Form. Studien in der Arbeitsgruppe Steinle zeigten, dass NKp65 Homodimere ausbildet und bei Interaktion mit KACL an einem Tyrosin phosphoryliert wird (Bauer, Wotapek, Zöller, Rutkowski, & Steinle, 2017).

Unter den Maus Clr-Molekülen ist Clr-b am besten erforscht. Die Expression von Clr-b sowohl in hämatopoetischen als auch nicht-hämatopoetischen Geweben zeigt eine breite Gewebeverteilung (Leibelt et al., 2014). Auf malignen, gestressten oder viral infizierten Zellen konnte eine reduzierte Clr-b Expression beobachtet werden (Carlyle et al., 2004; Fine et al., 2010). Die somit verminderte Interaktion des Clr-b Moleküls mit dessen inhibierenden Rezeptor Nkrp1d resultiert in einer verstärkten Empfindlichkeit gegenüber der NK-Zell Lyse (Iizuka et al., 2003; K. J. N. Williams et al., 2012). Da dieser Mechanismus an das Erkennen von MHC-Klasse-I Molekülen durch NK-Zellen erinnert, die dadurch körpereigene gesunde von infizierten und entarteten Zellen unterscheiden können, wurde dieser Mechanismus als eine andere Form des „Fehlenden Selbst“ Erkennungssystems (engl. „missing-self“) von NK-Zellen vorgeschlagen (Carlyle et al., 2004; B. F. M. Plougastel & Yokoyama, 2006). Unterstützung zu dieser Annahme lieferte eine erst kürzlich publizierte Studie unter Verwendung eines Knochenmark Transplantationsmodells (Chen et al., 2015b). Es wurde eine besondere und nicht redundante Rolle für die Clr-b/Nkrp1d Interaktion bei der Erkennung von hämatopoetischen Zellen aufgezeigt. In unserer Arbeitsgruppe wurde erst kürzlich gezeigt, dass Clr-f ausschließlich auf der Oberfläche von differenzierten intestinalen Epithelzellen vorzufinden ist (Leibelt et al., 2014). Die Bindung von Clr-f an dessen Rezeptor Nkrp1g führte zur Inhibierung der Effektorantworten von Nkrp1g+ Zellen. Die selektive Expression von Nkrp1g auf einer CD103⁺ intestinalen IEL Subpopulation lässt zu der Annahme kommen, dass dieses im gleichen Gewebe lokalisierte Rezeptor-Liganden-Paar explizit zur Immunüberwachung des Darmes in Mäusen beitragen könnte. Bislang sind die meisten Mitglieder der Clr Familie nur unzureichend charakterisiert, sodass das Expressionsmuster, ein möglicher Rezeptor und die physiologische Funktion dieser Moleküle weitgehend unbekannt sind.

1.3.4 Das C-Typ Lektin ähnliche Molekül Clr-a

Clr-a wird durch das Gen *Clec2e* kodiert, welches in der Maus auf Chromosom 6 zwischen *Nkrp1f* und *Nkrp1e* lokalisiert ist. Insgesamt 5 Exons erstrecken sich über 9 kb-Paare (Kirkham & Carlyle, 2014) und kodieren die für CTLRs typische Proteinstruktur bestehend aus der cytoplasmatischen Domäne, der Transmembrandomäne, dem Stalk-Bereich und der carboxyterminalen CTLD (Abbildung 10A). Bis auf die genomische Struktur von *Clec2e* waren zu Beginn der Dissertation nahezu keine Informationen zu Clr-a in Publikationen und Internet-Datenbanken vorhanden. Martick et al. beschrieb im Jahre 2008, dass die Expression der *Clec2e* mRNA-Transkripte, ebenso wie die *Clec2d* (kodierend für Clr-b) Transkripte, durch hoch aktive Hammerhead Ribozyme posttranskriptionell reguliert wird. Das aktive Hammerhead Ribozym wird in der 3'UTR zwischen dem Stopp-Codon und der Poly-A –Sequenz gebildet. Die Versuche in der Studie von Martick zeigen, dass die Ausbildung dieses Ribozyms in einer cis-Spaltung der 3'UTR und somit der Reduktion der Genexpression resultiert (Martick, Horan, Noller, & Scott, 2008; Scott, Horan, Martick, & Mol Biol Transl Sci, 2013). Die eukaryontische 3'UTR enthält eine Reihe an Motifen, die posttranskriptionell die Genregulation regulieren. miRNAs und eine Reihe an RNA-bindenden Proteinen binden in der 3'UTR und verändern die Prozessierung, die Anzahl und die Lokalisierung des Transkripts (Scott et al., 2013). Von insgesamt 12 CLEC2 Hammerhead Ribozymen in 9 Säugetierspezies existieren zwei in der Maus und drei in der Ratte (Scott et al., 2013). In in vitro Spaltungsversuchen spaltete die 3'UTR jedoch das *Clec2e*-Transkript im Vergleich zu *Clec2d* nur in einem sehr geringen Ausmaß. Eine mögliche Erklärung hierfür liegt laut Martick et al. an einer schlechten Faltung oder einer schwächeren Ausbildung der Sekundärstruktur, da die intervenierende Sequenz im Ribozym 450 Nukleotide länger ist als bei *Clec2d*. Seitdem wurde die Rolle der möglichen CLEC2 Hammerhead Ribozyme als destabilisierender Faktor bei der Regulation der mRNA-Transkripte nicht weiter untersucht.

Zhang et al., untersuchte im Jahre 2012 die Expression der Clr Moleküle auf Transkriptebene. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Dr. Stefan Leibelt in unserer Arbeitsgruppe konnte für Clr-a eine restringierte Expression der Transkripte im Darm aufgezeigt werden (Q Zhang, Rahim, Allan, Tu, & Belanger, 2012). Zhang beschrieb jedoch, dass die *Clec2e*-Transkripte nur schwach exprimiert wurden. Zur Interaktionsanalyse der phylogenetisch und funktionell konservierten Rezeptoren *Nkrp1f* und *Nkrp1g* in der Maus und in der Ratte wurden 293T unter anderem transient mit *Clec2e* cDNA (mit Tag) transfiziert (Kveberg et al., 2011). Clr-a wurde von keinem der beiden Rezeptoren erkannt. Allerdings konnte in diesen Studien in der Durchflusszytometrie fast keine Oberflächenexpression von Clr-a auf den 293T beobachtet werden. Expressionsstudien zu Clr-a sind aufgrund eines fehlenden Clr-a Antikörpers bislang nicht publiziert worden. Clr-f (kodiert durch *Clec2h*) ist das zu Clr-a am stärksten verwandte Protein und beide Proteine bilden einen separaten phylogenetischen Stamm aus (B.

Plougastel et al., 2001). In Abbildung 10 ist ein Sequenzvergleich der homologen AS-Sequenzen von Clr-a und Clr-f in der Maus und in der Ratte dargestellt. Die für C-Typ Lektin-ähnliche Rezeptoren charakteristischen Eigenschaften („WIGL“-Motif, konservierte Cysteine, siehe Abschnitt 3.1) sowie die N-Glykosylierungsstellen sind hervorgehoben. Die Vorhersagen der Glykosylierungsstellen erfolgte unter Verwendung des NetNGlyc 1.0 und NetOGlyc 4.0 Programms. Clr-a enthält keine O-glykosidischen Verbindungen. Auf cDNA Ebene weist Clr-a eine Homologie zwischen

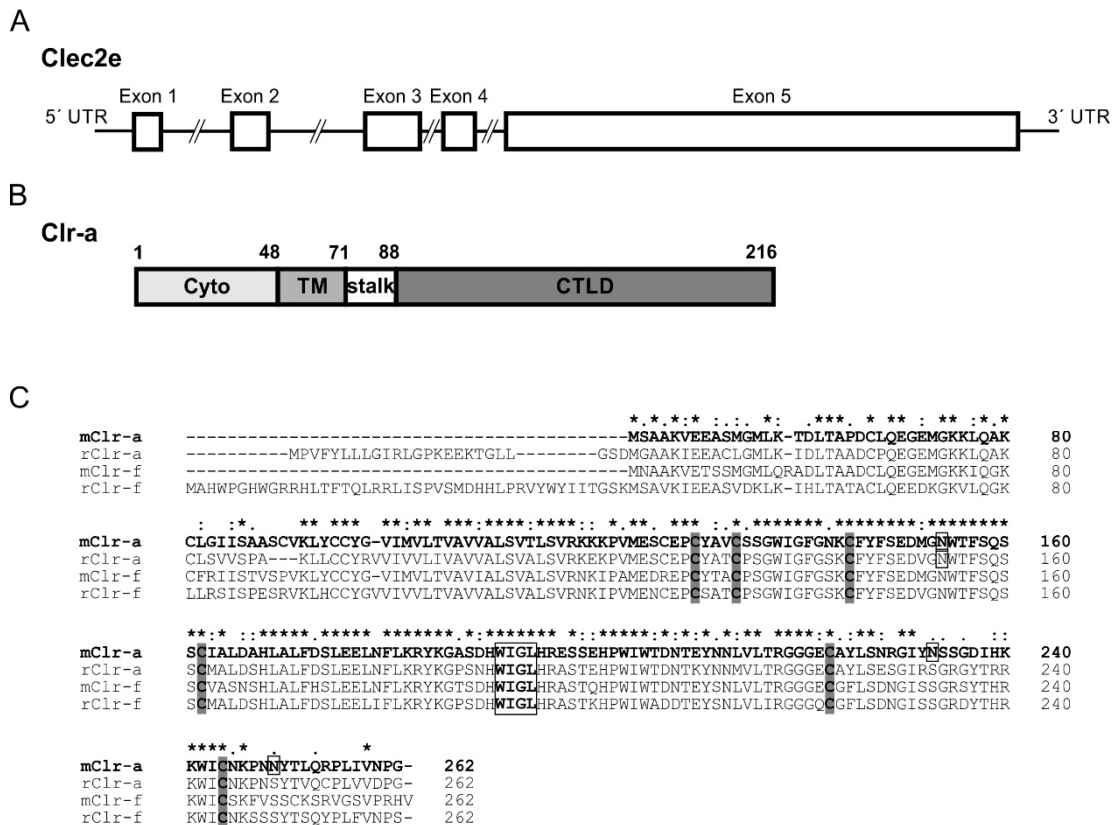


Abbildung 10: Genlocus, Domänenstruktur und Sequenzvergleich des von dem *Clec2e* Gen kodierten C-Typ Lektin-ähnlichen Moleküls Clr-a. (A-B) Darstellung des Clr-a kodierenden Genlocus *Clec2e* auf Chromosom 6 in der Maus. Fünf Exons kodieren das Clr-a Protein (216 AS), welches eine für C-Typ Lektin-ähnliche Moleküle typische Struktur aus einer cytoplasmatischen Domäne (Cyto), einer Transmembrandomäne (TM), einem Stalk-Bereich (stalk) und der carboxyterminalen C-Typ Lektin-ähnlichen Domäne (CTLD) aufweist. (C) Vergleich der AS-Sequenzen von Clr-a und Clr-f in der Maus (mClr-a, mClr-f) und in der Ratte (rClr-a, rClr-f). Konservierte Cysteine sind grau hinterlegt, das charakteristische „WIGL“-Motif sowie die N-Glykosylierungsstellen mit einem Kasten umrandet. 100 % Übereinstimmung der AS ist mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet, Unterschiede mit ein oder zwei Punkten markiert. Analyse erfolgte unter Verwendung des Programms ClustalX. AS=Aminosäure

den BL6, Balb/C und 129 Mausstämmen von 98-99 % und auf AS-Ebene zwischen 97-99 % (Q Zhang et al., 2012). Sowohl für Clr-a als auch Clr-f sind orthologe Sequenzen in der Ratte (*Rattus norvegicus*) kodiert. Über das zu Clr-a orthologe Protein Clr10 ist auf Transkriptebene eine starke Expression im

Thymus, im Knochenmark, in den dendritischen Zellen und den peritonealen Makrophagen beschrieben worden (Flornes et al., 2010). Eine mittlere Expressionsstärke wurde in der Leber, Milz, in den CD4 und den CD8 T Zellen sowie den Granulozyten beschrieben.

Somit sind für Clr-a nur sehr wenige Daten zur Expression, Interaktion sowie einer möglichen Funktion vorhanden, woraus sich im Rahmen dieser Dissertationsschrift die folgende Zielsetzung ergibt.

1.4 Zielsetzung

Der Natürliche Killer Genkomplex (NKC) von Säugern kodiert C-Typ Lektin-ähnliche Immunrezeptoren darunter auch die Mitglieder CLEC2 Familie, die in der Maus neben dem Aktivierungsmarker CD69 auch sieben Clr-Moleküle umfassen (B. Plougastel et al., 2001). Die Expression und Funktion einiger Vertreter der CLEC2 Familie ist bislang nur unzureichend oder gar nicht charakterisiert. Studien sowohl beim Menschen als auch bei der Maus zeigten, dass einige Vertreter der CLEC2 Proteinfamilie vor allem von hämatopoetischen Zellen exprimiert werden und an Nkrp1 Immunrezeptoren von Natürlichen Killerzellen binden, die eng gekoppelt mit CLEC2 Molekülen im NKC kodiert sind (Iizuka et al., 2003; Vogler & Steinle, 2011). Andere CLEC2 Moleküle hingegen, wie z.B. humanes KACL oder Maus Clr-f zeigen eine stark gewebespezifische Expression auf Keratinozyten bzw. Darmepithelzellen und werden daher in dem Kontext einer gewebespezifischen Immunüberwachung der Haut beziehungsweise des Darmes diskutiert (Qiang Zhang et al., 2012). Über das durch das Gen *Clec2e* im NKC der Maus kodierte Clr-a Molekül war zu Beginn der Arbeit aus der Literatur nichts bekannt. Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe Steinle deuteten auf eine gewebespezifische mRNA Expression von *Clec2e* im Dünndarm und Kolon der Maus sowie auf eine verminderte Oberflächenexpression im Vergleich zu anderen Clr-Molekülen hin. Aufgrund dieser Vorbefunde wurden für diese Arbeit folgende Ziele definiert:

- Darstellung der Gewebeexpression des *Clec2e* kodierten Glykoproteins Clr-a
- Biochemische Charakterisierung von Clr-a inklusive der Analyse einer möglichen Heterodimerbildung mit anderen Clr-Molekülen
- Vergleich der Expression und subzellulären Lokalisation von Clr-a und Clr-f
- Identifikation eines potentiellen Interaktionspartners/Rezeptors von Clr-a
- Untersuchungen zur funktionellen Regulation des Clr-a Glykoproteins

Diese Untersuchungen sollten erstmalig die molekularen Eigenschaften, die Expression, die Regulation und eine mögliche Funktion des Maus Moleküls Clr-a charakterisieren und damit auch zu einem besseren Verständnis der biologischen Relevanz der CLEC2-Familienmitglieder insgesamt beitragen. Schließlich sollten dadurch auch neue Einblicke in die Immunbiologie des Darmtraktes gewonnen werden.

2 Materialien

2.1 Antikörper

Tabelle 3: Primärantikörper und Isotypkontrollen

Bezeichnung	Spezifität	Isotyp (Spezies)	Herkunft (Hersteller)
Aktin-HRP	Aktin	IgG1 (Ziege)	Santa-Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA)
M2	FLAG-Peptid	IgG1 (Maus)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
M2-bio	FLAG-Peptid	IgG1 (Maus)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
EpCAM-A20	EpCAM		Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX)
Clr-f 10A6	Clr-f	IgG2a (Ratte)	laboreigene Herstellung
Clr-a 2E3	Clr-a	IgG2a (Ratte)	eigene Herstellung
Clr-a 4G7	Clr-a	IgG2a (Ratte)	eigene Herstellung
Clr-a/Clr-f 3C7	Clr-a und Clr-f	IgG2b (Ratte)	eigene Herstellung
OMA6	KACL	IgG2a (Maus)	laboreigene Herstellung
Anti-Nkrp1g 8A10	Nkrp1g	IgG1 (Ratte)	laboreigene Herstellung
7G5	NKp65	IgG1 (Maus)	laboreigene Herstellung
5D12	NKp80	IgG1 (Maus)	laboreigene Herstellung
c-Myc 9E10	c-Myc	IgG1 (Maus)	Abteilung Immunologie (Universität Tübingen, Deutschland)
EpCAM-FITC Klon G8.8	EpCAM	IgG2a (Ratte)	BioLegend (London, UK)
CD45.2-PE	CD45	IgG2a (Maus-SJL)	BioLegend (London, UK)
CD45.2-PerCP	CD45	IgG2a (Maus-SJL)	BioLegend (London, UK)
CD56-PE	CD56	IgG1 (Maus)	Beckman Coulter (Brea, USA)
CD103-APC	CD103	IgG (armenischer Hamster)	BioLegend (London, UK)
CD107a-APC	CD107a	IgG1 (Maus)	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)

Tabelle 4: Sekundärantikörper

Bezeichnung	Spezifität	Isotyp (Spezies)	Herkunft (Hersteller)
Maus IgG-APC	IgG	IgG F(ab) ₂ (Ziege)	Jackson ImmunoResearch (West Grove, USA)
Maus IgG-PE	IgG	IgG F(ab) ₂ (Ziege)	Jackson ImmunoResearch (West Grove, USA)
Maus IgG-HRP	IgG	IgG F(ab) ₂ (Ziege)	Jackson ImmunoResearch (West Grove, USA)
Ziege IgG-HRP	IgG	IgG F(ab) ₂ (Kaninchen)	Jackson ImmunoResearch (West Grove, USA)
Maus IgG-Cy3	IgG	IgG F(ab) ₂ (Ziege)	Jackson ImmunoResearch (West Grove, USA)
Ratte-IgG-AF647	IgG	IgG F(ab) ₂ (Maus)	Jackson ImmunoResearch (West Grove, USA)
Ratten-IgG-HRP	IgG	IgG F(ab) ₂ (Ziege)	Jackson ImmunoResearch (West Grove, USA)
human IgG1-PE	IgG1	IgG F(ab) ₂ (Ziege)	Jackson ImmunoResearch (West Grove, USA)

2.2 Rekombinante Proteine

Tabelle 5: Rekombinante Proteine

Bezeichnung	Firma/Herkunft
Clr-a Fc	laboreigenes rekombinantes Protein
Clr-f Fc	laboreigenes rekombinantes Protein
Clr-f_Clr-a Fc	laboreigenes rekombinantes Protein
KACL-Fc	laboreigenes rekombinantes Protein
Streptavidin-APC	Jackson ImmunoResearch (West Grove, USA)
Streptavidin-PE	Jackson ImmunoResearch (West Grove, USA)
Streptavidin-HRP	Jackson ImmunoResearch (West Grove, USA)
lösliches Clr-a	laboreigenes rekombinantes Protein
lösliches Clr-f	laboreigenes rekombinantes Protein
lösliches Clr-f	laboreigenes rekombinantes Protein

2.3 Bakterienstämme

Tabelle 6: Bakterienstämme

Bezeichnung	Herkunft
<i>Escherichia Coli</i> DH5a	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
<i>Escherichia Coli</i> Top10	Eigene Herstellung

2.4 Chemikalien

Tabelle 7: verwendete Chemikalien

Bezeichnung	Herkunft
Acrylamid/Bisacrylamid 40 % w/v	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Agarose Standard (Roti® Agarose)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Ammoniumpersulfat (APS)	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Ampicillin	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
BSA	PAA (Pasching, Österreich)
Chloroform	Sigma (Steinheim, Deutschland)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	J.T. Baker (Deventer, Niederlande)
Ethanol (reinst)	Sigma (Steinheim, Deutschland)
Ethidiumbromid-Lösung 1 %	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Glycin (zur Analyse)	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Imidazol ultrapure	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Isopropanol	Sigma (Steinheim, Deutschland)
Kanamycin	MP Biomedicals (Solon, USA)
Luria Bertani (LB)-Medium	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Magermilchpulver (Sucofin)	TSI GmbH (Zeven, Deutschland)
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Methanol	Sigma (Steinheim, Deutschland)
Natriumchlorid	Sigma (Steinheim, Deutschland)
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Nonidet-P40 (NP-40)	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
para-Formaldehyd	Sigma (Steinheim, Deutschland)
PBS (10x)	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
SDS	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Triton X-100	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Trizma® Base	Sigma (Steinheim, Deutschland)

Bezeichnung	Herkunft
Trypanblau	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Tween-20	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Wasserstoffperoxid (30 %)	Sigma (Steinheim, Deutschland)

2.5 Enzyme

Tabelle 8: Enzyme für molekularbiologische und proteinbiochemische Methoden

Bezeichnung	Firma
DNase I (RNase-frei)	Promega (Mannheim, Deutschland)
M-MLV reverse Transkriptase (H-)	Promega (Mannheim, Deutschland)
Phusion-Polymerase	Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA)
Restriktionsendonukleasen	NEB (Frankfurt, Deutschland), Fermentas, Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA)
Shrimp alkaline phosphatase (SAP)	Fermentas, Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA)
T4 DNA Ligase	Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA)
Taq-Polymerase	NEB (Frankfurt, Deutschland)
Endoglykosidase H (Endo H)	NEB (Frankfurt, Deutschland)
Peptid:N-Glykanase F (PNGase F)	NEB (Frankfurt, Deutschland)
Poly (I:C) HMW	Sigma (Steinheim, Deutschland)
Golgi-Stop	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)

2.6 Größenstandards

Tabelle 9: Größenstandards für molekularbiologische und proteinbiochemische Methoden

Bezeichnung	Firma
Quickload 2-log ladder DNA-Marker	NEB (Frankfurt, Deutschland)
Quickload 50bp ladder DNA-Marker	NEB (Frankfurt, Deutschland)
SeeBlue® Plus2 Novex Sharp Proteinmarker	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)

2.7 Kit-Systeme

Tabelle 10: Kit-Systeme

Bezeichnung	Hersteller
EasyPrep Pro Plasmid Mini Kit	Biozym Scientific (Hessisch Oldendorf, Deutschland)
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
QIAGEN Plasmid Midi Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)

Bezeichnung	Hersteller
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
QIAprep Spin Maxiprep Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)

2.8 Laborgeräte

Tabelle 11: Laborgeräte

Bezeichnung	Typ, Herkunft
Agarosegelelektrophoresekammer	PeqLab (Erlangen, Deutschland)
Bakterieninkubator Heraeus	Thermo Fisher Scientific (Rockford USA)
Bakterienschüttler MAXQ 4000	Thermo Fisher Scientific (Rockford USA)
Brutschrank für Zellkulturen HeraCell 150i	Thermo Fisher Scientific (Rockford USA)
Captair® Flow Werkbank	Erlab (Köln, Deutschland)
Durchflusszytometer FACSCanto™ II	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
Echtzeit-PCR-Thermozykler StepOnePlus	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
Einfrierbehälter Nalgene für Zellen	Thermo Fisher Scientific (Rockford USA)
Elektroporationsgerät Gene Pulser Xcell	Bio-Rad Laboratories (München, Deutschland)
Elektroporationsküvetten 4 mm	Bio-Rad Laboratories (München, Deutschland)
Entwicklungsmaschine für Röntgenfilme	CP1000, Agfa (Mortsel, Belgien)
Fluoreszenzmikroskop DMI6000B	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Flüssigkeitschromatographie-System ÄKTA purifier 10	GE Healthcare (München, Deutschland)
gentleMACS™ Dissociator	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)
Glaskugelsterilisator STERI 250	Sigma (Steinheim, Deutschland)
Heizblock	PeqLab (Erlangen, Deutschland)
Horizontalschüttler Promax 2020	Heidolph (Schwalbach, Deutschland)
Konfokales Mikroskop LSM 510 Meta	Carl Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
Kryostat	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Laborwaage NewClassicMF	Sartorius Mechatronics (Göttingen, Deutschland)
Lichtmikroskop AE31	Motic (Xiamen, China)
Mikroplatten-Photometer Multiscan® Fc	Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA)
Mikrozentrifuge Heraeus Pico & Fresco 17	Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA)
Multipette	AbiMed (Langenfeld, Deutschland)
Neubauer-Zählkammer	Roth (Karlsruhe, Deutschland)

Bezeichnung	Typ, Herkunft
pH-Meter PB-11	Sartorius Mechatronics (Göttingen, Deutschland)
Pipette, Mehrkanalpipette	AbiMed (Langenfeld, Deutschland)
Pipettierhilfe	Integra Biosciences (Zizers, Schweiz)
Präzisionswaage TE64	Sartorius Mechatronics (Göttingen, Deutschland)
Rotator LD79	Labinco (Breda, Niederlande)
Röntgenfilm Entwicklerstation CP1000	Agfa (Mortsel, Belgien)
Schüttler	Promax, Heidolph (Schwalbach, Deutschland)
SDS-PAGE Elektrophoresesystem Mini-PROTEAN® Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories (München, Deutschland)
Spannungsquellen PowerPac & peqPOWER 300	Bio-Rad Laboratories (München, Deutschland) & PeqLab (Erlangen, Deutschland)
Sterilwerkbänke	Integra Biosciences (Zizers, Schweiz) & Thermo Fischer Scientific (Rockford, USA)
Thermozykler Primus 25 & peqSTAR 96 Universal Gradient	PeqLab (Erlangen, Deutschland)
UV-Tisch mit Dokumentations-System E-box	PeqLab (Erlangen, Deutschland)
UV/VIS-Spektrometer Nano-Photometer	Implen (München, Deutschland)
Vortexer	IKA-Werke (Staufen, Deutschland) & PeqLab (Erlangen, Deutschland)
Western Blot-Apparatur	Cti GmbH (Idstein, Deutschland)
Wippschüttler Duomax 1030	Heidolph (Schwalbach, Deutschland)
Zählkammer Neubauer (verbessert)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Zentrifugen Heraeus Multifuge 1S-R & Sorvall RC6+	Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA)

2.9 Oligonukleotide

Tabelle 12: Oligonukleotide verwendet in quantitativer Echtzeit-PCR

Oligonukleotidbezeichnung	Sequenz (5' - 3')
Clr-a forward	ATGGGCATGCTGAAGACAGAC
Clr-a reverse	CAAGATGCAGCGGAGATGAT
Clr-f forward	GAATATAGCAACTTGTTCTC
Clr-f reverse	GGATTTACAACACTGACAAAC
EpCAM forward	GACGACGTGGACATAGCTGA
EpCAM reverse	CCGTTCACTCTCAGGTCCAT
CD45 forward	CAAACAGAAGCTTCCCAAGG

Oligonukleotidbezeichnung	Sequenz (5' - 3')
CD45 reverse	AGGCACAGAACCAACCTGTC
18S rRNA forward	CGGCTACCACATCCAAGGAA
18S rRNA reverse	GCTGGAATTACCGCGGCT
TBP forward	AGCTCTGGAATTGTACCGCA
TBP reverse	TGACTGCAGCAAATCGCTTG

Tabelle 13: Oligonukleotide verwendet zur Klonierung und Mutagenese

Oligonukleotid-bezeichnung	Sequenz (5' - 3')
BamHI-Linker-stalkClra_for	CAGCGGATCCGGAGGAGGAAGCGGAGGAGGAAGCGTGAGAAAGAAAAAC
BamHI-Linker-stalkClrf_for	CAGCGGATCCGGAGGAGGAAGCGGAGGAGGAAGCGTGAGAAATAAAATC
BamHI-Linker-stalkKACL_for	CAGCGGATCCGGAGGAGGAAGCGGAGGAGGAAGCGCCACATGGTCCAAG
BirA-Clrfstalk-for	TCGAATGGCACGAAAAGCAGCCGGCCATGGAAGACCGTGAACCTTGCTACACC
BirA-Clrfstalk-rev	AAATCCAATCCAGCCACTTGAGCATGCGGTGTAGCAAGGTTACAG
BirA-Clrfstalk-rev	AGCAAGGTTACAGGTCTTCCATGGCCGGCTGCTTTTCGTGCCAT
BirA-Clrfstalk-rev	TTCACGGTCTTCCATGGC CGGCTGCTTTTCGTGCCATT
CD3zeta_Nkrp1a_TM_for	GCATATGCAGACCCTGGCCCCCTCGCGCTGGGCTCATCCTCCTTGTCGTGA
CD3zeta_Nkrp1c_TM_for	GCATATGCAGACCCTGGCCCCCTCGCGCTGGGCTCATCCTCCTTGTCCTGA
CD3zeta_Nkrp1d_TM_for	GCATATGCAGACCCTGGCCCCCTCGCTTTGGCTGTGCTGGCCTCATCCTTC
Clra (A36G)-rev	GGAGATGATTCCGAGACATTTTCCTTGG
Clra (L34I)(A36G)-rev	CAGTAAAGTTTAACACAAGATGCAGCGGAGATGATTCCGAGACATTTTCCTTGGATTT
Clra (L34I)-rev	AGATGATTCCGAGACATTTTGCTTGGAGT

Oligonukleotid -bezeichnung	Sequenz (5' - 3')
Clra (LG39FR)- rev	CTCCATAGCAGCAGTAAAGTTTAACACAAGATGCAGCGGAGATGATTCTGAAACA
Clra (A36G)- for	GAGAAATGGGTAAAAAACTCCAAGGAAAATGTCTCGG
Clra (A87T)_for	TGCTACACCGTATGCTCAAGTGGCTGGA
Clra (A87T)_rev	GCATACGGTGTAGCAAGGTTACAGCT
Clr-a (KI)_for	GTGAGAAAGAAAATCCCAGTCATGGA
Clr-a (KKK_NKI)_for	GTGAGAAATAAAATCCCAGTCATGGAGA
Clr-a (KN)_for	GTGAGAAATAAAAAACCGTCATGGAGAGC
Clra (L34I)(A36G)- for	CCCAGACTGCCTGCAGGAGGGAGAAATGGGTAAAAAAATCCAAGGAAAA
Clra (L34I)-for	AGGAGGGAGAAATGGGTAAAAAAATCCAAGCA
Clra (LG39FR)- for	GCCTGCAGGAG GGAGAAATGGGTAAAAAACTCCAAGCAAATGTTTCAGAATCATC
Clr-a STOP_dsRED_ for	ACTAATTGTAAATCCCGGATAGGATCCGCCCTCTCCCTC
Clra_(V88A)_f or	TGCTACGCTGCATGCTCAAGTGGCTGG
Clra_(V88A)_r ev	GCATGCAGCGTAGCAAGGTTACAGCT
Clr-a_CTLD - Clr-f_neck - reverse	AAATCCAATCCAGCCACTTGAGCATGCGGTGTAGCAAGGTTGCT
Clr-a_Cyto - Clr-f_TM - forward	AGCCGCTGCATCTTGTGTTAACTTTACTGCTGCTATGGAGTGATC
Clr-a_neck - Clr-f_TM - reverse	CATGACTGGTTTTTTCTTTCTCACTGACAAAGCAACTGAAAGAGCAAT
Clr-a_rev	TCCGGGATTTACAATTAGTGGGCGC
Clra_stalk1_fo r	GTGAGAAATAAAATCCCAGTCATGGAGAGCTGT
Clra_stalk1_re v	GATTTTATTTCTCACCACTGACAAAGTAACAGA

Oligonukleotid -bezeichnung	Sequenz (5' - 3')
Clra_stalk2_for	CCAGCCATGGAAGACCGTGAACCTTGCTATGCTGTA
Clra_stalk2_rev	CACGGTCTTCCATGGCTGGTTTTTCTTTCTCACTGA
Clra_stalk3_for	TGCTACACCGCATGCTCAAGTGGCTGGATTGGATT
Clra_stalk3_rev	GCATGCGGTGTAGCAAGGTTACAGCTCTCCATGAC
Clr-a_TM - Clr-f_Cyto - reverse	GATCACTCCATAGCAGCAGTAAAGTTTAACAGGAGACACAGTGGCT
Clr-a_TM - Clr-f_neck - forward	AGCGTTGCTCTTTCTGTTACTTTGTGAGAGAAATAAAATCCCAGCCATG
Clr-a_TM rev	TGACAAAGTAACAGAAAGAGCAACTAC
Clr-a+Clr-f_for	TACTGCTGCTATGGAGTGATC
Clr-a+Clr-f_rev	CCAAATCCAATCCAGCCACT
ClraCyto_Clrf Cyto.1(1-12) - rev	TGTCTTCAGCATGCCCATGGAACCTGTTTCAACCTT
ClraCyto_Clrf Cyto.2(13-27) -for	AAGAGGCTTCCATGGGCATGCTGCAGAGGGCAGACCTCACTGCTGCAGA
ClraCyto_Clrf Cyto.2(13-27) -rev	TCCCTCCTGCAGGCAGTCTGCAGCAGTGAGG
ClraCyto_Clrf Cyto.3(28-41) -for	CAGGAGGGAGAAATGGGTAAAAAATCCAAGGA
ClraCyto_Clrf Cyto.3(28-41) -rev	CACAAGATGCAGCGGAGATGATTCTGAAACATTTTCCTTGGATTTTTT
ClraCyto_Clrf Cyto.4(42-49) -for	GCAAAATGTCTCGGAATCATCTCCACTGTGTCTCCT
ClraCyto_Clrf Cyto.4(42-49) -rev	TCCATAGCAGCAGTAAAGTTTAACAGGAGACACAGT
Clra-for	CACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAAGGATCCGGAGGAGGAAGCGGAGGAG GAAGCGTGAGAAAGAAAAAACCAGTCATGGAGAGCTGT

Oligonukleotid -bezeichnung	Sequenz (5' - 3')
Clra-rev	AACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGCCAGCTAGCCTATCCGGGATTACAAATTAGTGG GCGCTGTAAGGTGTA
Clr-a- TM_CD3zeta- reverse	CTATGATCACTCCATAGCAGCAGTAAAGGCGAGGGGCCAGGGTCTGCA
Clr-aTM_Clr-f neck MUT - forward	TGTTACTTTGTCAGTGAGAAATAAAATC
Clr-aTM_Clr-f neck MUT - forward	TGTTACTTTGTCAGTGAGAAATAAAATC
Clr-aTM_Clr-f neck MUT - reverse	GATTTTATTTCTCACTGACAAAGTAACA
Clr-aTM_Clr-f neck MUT - reverse	GATTTTATTTCTCACTGACAAAGTAACA
Clr-aTM_Clr-f neck MUT 2- reverse	CATGGCTGGGATTTTATTTCTCACTGACAAAGTAACAGAAAGAG
Clr-aTM_Clr-f neck MUT2 - forward	CTCTTTCTGTTACTTTGTCAGTGAGAAATAAAATCCCAGCCATG
Clr-f rev	CACATGCCTTGGTACACTTCTA
Clrf stalk_Clr-a - for2	ACTTTGTCAGTGAGAAATAAAATCCCAGCCATGGAAGACCGTGAACCT
Clrf stalk_Clr-a - rev2	AATCCAGCCACTTGAGCATGCGGTGTAGCAAGGTTACGGTCTTCCAT
Clr-f STOP_pIRES GFP_for	AAGTGTAACAAGGCATGTGTAGGGATCCGCCCCCTCTCC
Clrf(G36A)-for	TGCAGGAGGGAGAAATGGGTAAAAAATCCAAGCAAAATGTTTCAG
Clrf(G36A)-rev	CAGTGGAGATGATTCTGAAACATTTTGCTTGG
Clrf(I34L)-for	AGGAGGGAGAAATGGGTAAAAAATCCAAGGA
Clrf(I34L)-rev	CAGTGGAGATGATTCTGAAACATTTTCCTTGGAG
Clrf-for	CACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAAGGATCCGGAGGAGGAAGCGGAGGAG GAAGCGTGAGAAATAAAATCCCAGCCATGGAAGACCGT
Clrf-rev	TCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGCCAGCTAGCCTACACATGCCTTGGTACAC TTCCTACTCTGGATT

Oligonukleotid-bezeichnung	Sequenz (5' - 3')
Clrfstalk_Clr-for	GCCATGGAAGACCGTGAACCTTGCTACACCGCATGCTCAAGTGGCTGGATTGGA
Clrfstalk_Clr-rev	TTCACGGTCTTCATGGCTGGGATTTTATTTCTCACTGACAAAGTAACAGAAAGAGC
Clr-f-stalk_Ly49a-TM-reverse	CTACCATGGCTGGGATTTTATTTCTCACCATGTTGCTGCAGTTATTGTGGTGG
Clrfstalk-ClraCTLD-for	AAGACCGTGAACCTTGCTACACCGCATGCTCAAGTGGCTGGATTGG
Clr-f-TM_CD3zeta-reverse	CTAGATCACTCCATAGCAGCAGTAAAGGCGAGGGGCCAGGGTCTGC
FLAG_STOP_RSV_rev	ATCTTATCATGTCTGGATCCTACTTGTCATCGTCGTCCTTGT
FLAG-BamHI_rev	GCTGGATCCCTACTTGTCATCGTCGTCCTTGTA
Gapdh, Mus musculus forward	CCTCGTCCCGTAGACAAAATG
Gapdh, Mus musculus reverse	TGAAGGGGTCGTTGATGGC
KACL-for	CACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAAGGATCCGGAGGAGGAAGCGGAGGAGGAAGCGCCACATGGTCCAAGCATGCTAAACCTGTGGCA
KACL-rev	TCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGCCAGCTAGCCTATAAAAAATATTTAGGTTTGCTGCAAATCCACTT
Ly49TM_Nkrp1a stalk_for	ACCACCACAATAACTGCAGCAACATGCAAAAACCATCAATAGAAAAATGCTATGTGC
Ly49TM_Nkrp1c stalk_for	ACCACCACAATAACTGCAGCAACATGCAAAAACCATCAAGAGAAAAATGCTGTGTG
Ly49TM_Nkrp1d stalk_for	ACCACCACAATAACTGCAGCAACATGTCAGTACAAAAATCATCAGTACAAAAATCTGCG
NheI-stop-CTLD Clra_rev	GACTGCTAGCCTATCCGGGATTTACAATTAGTGGGCGCTG
NheI-stop-CTLD Clrf_rev	GACTGCTAGCCTACACATGCCTTGGTACACTTCCTACTC
NheI-stop-CTLD KACL_rev	GACTGCTAGCCTATAAAAAATATTTAGGTTTGCTGCAAATCC

Oligonukleotid -bezeichnung	Sequenz (5' - 3')
Nkrp1a stalk_for	CAAAAACCATCAATAGAAAAATGCTATGTGC
Nkrp1a TM_for	GCTGGGCTCATCCTCCTTGTCGTGA
Nkrp1c stalk_for	CAAAAACCATCAAGAGAAAAATGCTGTGTG
Nkrp1c TM_for	GCTGGGCTCATCCTCCTTGTCCTGA
Nkrp1d stalk_for	TCAGTACAAAAATCATCAGTACAAAAATCTGCG
Nkrp1d TM_for	TTTGGCTGTGCTGGCCTCATCCTTC
pFUSE for	TGCGCCGTTACAGATCCAAG
pFUSE for_hlgG	CATCGCCGTGGAGTGGGAGA
pFUSE_hlgG1 Fc2_for	CACAACCACTACACGCAGAAG
pFUSE_hlgG1 Fc2_rev	GTGGTTTGTCCAAACTCATC
pIRES_ClrCyt o.1(1-12) -for	AACC GTCAGATCCGCTAGCACC ATGAATGCTGCAAAG GTTGAAACGAGT
pIRES-Clr- f_Cyto - forward	ATGGTCAGATCCGCTAGCACCATGAATGCTGCAAAGGTTGAAACG
pMX_NotI_FL AG_rev	CGTAGCGGCCGCCTACTTGTCATCGTCGTCCTTGTA
pMX_Pacl_CD 3zeta_for	CTAGTTAATTAAGGATCCACCATGAGAGCAAATTCAGCAGG
Ppib, Mus musculus forward	AGGGACCTAAAGTCACAGTCAAG
Ppib, Mus musculus reverse	AGCCAAATCCTTTCTCTCCTGTAGC
RSV_CD3zeta- forward	ATCCTGCAGGTCGACGTCCGCGGCCACCATGAGAGCAAATTCAGCAGGAGTG
STOP_dsRED_ for	TAGGATCCGCCCTCTCCCT
STOP_pIRES GFP_for	TAGGGATCCGCCCTCTCCCT

Oligonukleotid -bezeichnung	Sequenz (5' - 3')
Tbp, Mus musculus forward	AGCTCTGGAATTGTACCGCA
Tbp, Mus musculus reverse	TGACTGCAGCAAATCGCTTG

2.10 Puffer und Lösungen

Tabelle 14: Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
DNA-Auftragspuffer (10x)	1 X TAE 0,25 % Orange G 50 % Glycerol
Elutionspuffer (HisTrap)	20 mM HNa ₂ PO ₄ 0,5 M NaCl 0,5 M Imidazol
Entwicklerlösung (Silberfärbung)	5 ml Entwickler (Kit) 1 Tropfen Entwickler (Formaldehyd) 45 ml ddH ₂ O
Färbelösung (Silberfärbung)	0,5 ml Färbemittel 50 ml ddH ₂ O
FACS-Puffer	1 x PBS 2 mM EDTA 2 % FCS 0,01 % Natriumazid
Fixierlösungen (Immunfluoreszenz)	100 % Aceton 75 % Aceton in ddH ₂ O 50 % Aceton in ddH ₂ O
Fixierlösung (Silberfärbung)	40 ml Ethanol 10 ml Essigsäure 20 ml ddH ₂ O
Luria-Bertani (LB)-Agar	LB-Medium 1,5 % Agar
LB-Agar mit Antibiotikum	LB-Agar 50 µg/ml Kanamycin oder 100 µg/ml Ampicillin

Bezeichnung	Zusammensetzung
LB-Medium	10 g Natriumchlorid 10 g Trypton 5 g Hefeextrakt Mit ddH ₂ O auf 1l auffüllen
LB- Medium mit Antibiotikum	LB-Medium 50 µg/ml Kanamycin oder 100 µg/ml Ampicillin
NP40-Lysepuffer	50 mM Tris-HCl, pH8,0 150 mM Natriumchlorid 1 % NP40
PBST	1 x PBS 0,05 % Tween 20
Sammelgelpuffer	1 M Trizma® Base, pH 6,8 bei RT
SDS-Elektrophoresepuffer	25 mM Trizma® Base 192 mM Glycin 0,1 % SDS
SDS-Probenpuffer (6x)	62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8 bei RT 25 % Glycerol 2 % SDS 5 % β-Mercaptoethanol 0,01 % Bromphenolblau
Sensibilisierungslösung (Silberfärbung)	15 ml Ethanol 5 ml Sensibilisator (Kit) 30 ml ddH ₂ O
TAE-Puffer (50x)	2 M Trizma® Base 0,05 M EDTA 57 % Essigsäure
TBS-Puffer (10x)	100 mM Tris-OH 1,5 M Natriumchlorid
TBST-Puffer	1 x TBS-Puffer 0,05 % Tween-20
Transferpuffer (Immunoblot)	25 mM Trizma® Base 192 mM Glycin 20 % Methanol
Trenngelpuffer	1,5 M Trizma® Base, pH 8,6 bei RT

Bezeichnung	Zusammensetzung
Trypanblau	1 x PBS 0,05 % Trypanblau 0,02 % Natriumazid
Waschlösung (Silberfärbung)	30 ml Ethanol 70 ml ddH ₂ O

2.11 Vektoren

Tabelle 15: Vektoren

Vektor	Firma/Herkunft
pFUSE_hlgG1_FcEQ_dSTOP_Clr-a	eigene Herstellung
pFUSE_hlgG1_FcEQ_dSTOP_Clr-f	eigene Herstellung
pFUSE_hlgG1_FcEQ_dSTOP_Clr-f_Clr-a CTLD	eigene Herstellung
pFUSE_hlgG1_FcEQ_dSTOP_KACL	eigene Herstellung
pFUSE2_FcEQ_dSTOP	AG Prof. Koch
pIRES2_dsRED	laboreigener Vektor
pIRES2_dsRED EXPRESS Clr-a_mycHis	laboreigener Vektor
pIRES2_dsRED-EXPRESS_Clr-a	eigene Herstellung
pIRES2_dsRED-EXPRESS_KACL_mycHis	laboreigener Vektor
pIRES2_eGFP	Clontech (Mountain View, USA)
pIRES2_eGFP_Clr-a (A35G)_FLAG	eigene Herstellung
pIRES2_eGFP_Clr-a (L33I)_FLAG	eigene Herstellung
pIRES2_eGFP_Clr-a FLAG	eigene Herstellung
pIRES2_eGFP_Clr-a_Clr-f CTLD	eigene Herstellung
pIRES2_eGFP_Clr-a_Clr-f Cyto_FLAG	eigene Herstellung
pIRES2_eGFP_Clr-a_Clr-f stalk_FLAG	eigene Herstellung
pIRES2_eGFP_Clr-a_Clr-f TM_FLAG	eigene Herstellung
pIRES2_eGFP_Clr-f	eigene Herstellung
pIRES2_eGFP_Clr-f (G36A)_FLAG	eigene Herstellung
pIRES2_eGFP_Clr-f (I34L)_FLAG	eigene Herstellung
pIRES2_eGFP_Clr-f Cyto.1(1-12)_Clr-a	eigene Herstellung
pIRES2_eGFP_Clr-f Cyto.2(13-27)_Clr-a	eigene Herstellung
pIRES2_eGFP_Clr-f Cyto.3(28-41)_Clr-a	eigene Herstellung
pIRES2_eGFP_Clr-f Cyto.4(42-49)_Clr-a	eigene Herstellung
pIRES2_eGFP_Clr-f Cyto_Clr-a TMstalkCTLD_FLAG	eigene Herstellung

Vektor	Firma/Herkunft
pIRES2_eGFP_Clr-f stalk_Clr-a FLAG	eigene Herstellung
pIRES2_eGFP_Clr-f_Clr-a CTLD	eigene Herstellung
pIRES2_eGFP_Clr-f_FLAG	eigene Herstellung
pIRES2_eGFP_Clr-fstalk2mut_Clr-a	eigene Herstellung
pIRES2_eGFP_Clr-fstalk3mut_Clr-a	eigene Herstellung
pMXsIP_CD3z_Ly49_Nkrp1A_FLAG	eigene Herstellung
pMXsIP_CD3z_Ly49_Nkrp1C_FLAG	eigene Herstellung
pMXsIP_CD3z_Ly49_Nkrp1D_FLAG	eigene Herstellung
pMXsIP_CD3z_Nkrp1A_FLAG	eigene Herstellung
pMXsIP_CD3z_Nkrp1C_FLAG	eigene Herstellung
pMXsIP_CD3z_Nkrp1D_FLAG	eigene Herstellung
pMXsIP	laboreigener Vektor
pSecTag2/Hygro B	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
RSV.5 neo_CD3z_Clr-a_FLAGHis	eigene Herstellung
RSV.5 neo_CD3z_Clr-f TM stalk_Clr-a CTLD_FLAGHis	eigene Herstellung
RSV.5 neo_CD3z_Clr-f_Clr-a_FLAGHis	eigene Herstellung
RSV.5 neo_CD3z_Clr-f_FLAGHis	eigene Herstellung
RSV.5 neo_CD3z_Nkrp1G_FLAGHis	laboreigener Vektor
RSV.5 neo_Clr-a_FLAGHis	laboreigener Vektor
RSV.5 neo_Clr-b_FLAGHis	laboreigener Vektor
RSV.5 neo_Clr-c_FLAGHis	laboreigener Vektor
RSV.5 neo_Clr-f_Clr-a CTLD_FLAGHis	laboreigener Vektor
RSV.5 neo_Clr-f_FLAGHis	laboreigener Vektor
RSV.5 neo_Clr-g_FLAGHis	laboreigener Vektor
RSV.5 neo_mock	laboreigener Vektor
RSV.5 neo_Nkrp1A_FLAGHis	laboreigener Vektor
RSV.5 neo_Nkrp1C_FLAGHis	laboreigener Vektor
RSV.5 neo_Nkrp1D_FLAGHis	laboreigener Vektor
RSV.5 neo_Nkrp1F_FLAGHis	laboreigener Vektor
RSV.5 neo_Nkrp1G_FLAGHis	laboreigener Vektor

2.12 Verbrauchsmaterialien

Die in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien, darunter Glaswaren, Plastikwaren und Einwegmaterialien, wurden von folgenden Firmen bezogen:

Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, Deutschland)

Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

GE Healthcare (München, Deutschland)

Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland)

Nunc (Wiesbaden, Deutschland)

Roth (Karlsruhe, Deutschland) und

Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland).

2.13 Software

In der vorliegenden Arbeit wurde mit folgender Software gearbeitet:

AxioVision (Zeiss, Oberkochen, Deutschland)

Adobe Photoshop (San Jose, USA)

Corel-DRAW Version X6 (Ottawa, Kanada)

FlowJo 9 (Ashland, USA)

GraphPad Prism 5 (La Jolla, USA)

ImageJ 1.47 (Bethesda, USA)

Mendeley

Microsoft Office (Redmond, USA)

Unicorn 5 (GE Healthcare, München, Deutschland)

ZEN (Zeiss, Oberkochen, Deutschland)

2.14 Sonstige Materialien

Tabelle 16: Sonstige Materialien

Material	Hersteller
Amersham Hyperfilm™ ECL	GE Healthcare (München, Deutschland)
Amicon Ultra-4 und Ultra-15 Zentrifugen-Filtereinheiten	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)
Dialyseschlauch (Ausschlussvolumen 15 kDa)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Gelfiltrationssäule: HiLoad™ 16/60 Superdex 200 prep grade	GE Healthcare (München, Deutschland)

HisTrap™ FF (1 ml)	GE Healthcare (München, Deutschland)
Magnetic Immuno Staining Tray (MIST)	CellPath (Newtown, UK)
Mini-PROTEAN® 4-20 % TGX™ Gel	Bio-Rad (München, Deutschland)
Nitrocellulosemembran	GE Healthcare (München, Deutschland)
Protein A/G UltraLink Resin	Pierce Protein Research Products, Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA)
Protein A Sepharose	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)
PVDF-Membran	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Säule für Protein A Sepharose	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)

2.15 Sonstige Reagenzien

Tabelle 17: Sonstige Reagenzien

Reagenz	Firma
Ampicillin	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
cOmplete, mini (Proteaseinhibitor)	Roche (Mannheim, Deutschland)
DAPI (Arbeitskonzentration 100 ng/ml)	Sigma (Steinheim, Deutschland)
dNTPs (10 mM)	Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA)
ECL Reagenz ("SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate")	Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA)
FastStart SYBR Green Master	Roche (Basel, Schweiz)
Fugene HD	Roche (Basel, Schweiz)
HRP Juice	PJK GmbH (Kleinblittersdorf, Deutschland)
InstantBlue	Expedeon (Harston, UK)
Ionomycin	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Kanamycin	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Magermilchpulver	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Nuklease-freies H ₂ O	Promega (Madison, USA)
peqGOLD TriFast	PeqLab (Erlangen, Deutschland)
PMA	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
ReBlot Plus Mild Stripping Lösung (10x)	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)
ProLong antifade Reagenz mit DAPI	Invitrogen (Paisley, UK)
Random Primer (100 ng/μl)	Promega (Madison, USA)
RNase-freies H ₂ O	5 PRIME (Hilden, Deutschland)
RNAasin (40 U/μl)	Promega (Madison, USA)
Roti-Quant	Roth (Karlsruhe, Deutschland)

Reagenz	Firma
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA)
UltraLink® Biosupport	Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA)
Zeocin	Invitrogen (Paisley, UK)

2.16 Zellkulturmedien und Zusätze

Tabelle 18: Zellkulturmedien und Zusätze

Bezeichnung	Firma
AppliFect	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
DMEM (high Glucose)	Gibco, Invitrogen (Paisley, UK), PAA (Pasching, Österreich) Sigma (Steinheim, Deutschland)
DMEM (low Glucose)	Gibco, Invitrogen (Paisley, UK), PAA (Pasching, Österreich) Sigma (Steinheim, Deutschland)
G-418-Sulfat	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA (Pasching, Österreich)
FugeneHD	Promega (Mannheim, Deutschland)
HEPES (1 M)	PAA (Pasching, Österreich)
Hygromycin B	PAA (Pasching, Österreich)
Hy 1	laboreigene Zusammenstellung
Hy 2	laboreigene Zusammenstellung
Hy 3	laboreigene Zusammenstellung
Hy 4	laboreigene Zusammenstellung
Hy 5	laboreigene Zusammenstellung
IMDM	PAA (Pasching, Österreich), LONZA (Köln, Deutschland)
L-Glutamin 200 mM	PAA (Pasching, Österreich), LONZA (Köln, Deutschland), Sigma (Steinheim, Deutschland)
Lysepuffer (10x)	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
Natriumpyruvat	PAA (Pasching, Österreich), LONZA (Köln, Deutschland), Sigma (Steinheim, Deutschland), Life Technologies, (Carlsbad, USA)
Dulbecco's PBS	PAA (Pasching, Österreich), LONZA (Köln, Deutschland), Life Technologies (Carlsbad, USA)
Penicillin/Streptomycin	PAA (Pasching, Österreich), LONZA (Köln, Deutschland), Sigma (Steinheim, Deutschland)
RPMI 1640	PAA (Pasching, Österreich), LONZA (Köln, Deutschland), Sigma (Steinheim, Deutschland)

Trypsin/EDTA	PAA (Pasching, Österreich), LONZA (Köln, Deutschland), Sigma (Steinheim, Deutschland)
Zellkulturwasser	PAA (Pasching, Österreich)

Tabelle 19: Zusammensetzung der Hybridomamedien Hy1 – Hy 5

Hy5	Hy4	Hy3	Hy2	Hy1
75% RPMI	80% RPMI	85% RPMI	80% RPMI	90% RPMI
10% FCS	10% FCS	10% FCS	20% FCS	10% FCS
10% CPSR-3	5% CPSR-3	5% CPSR-3	-	-
5% HES	5% HES	-	-	-
1 Ampulle HAT	1 Ampulle HT	1 Ampulle HT	-	-

2.17 Zelllinien

Tabelle 20: Zelllinien

Name	Zelltyp	Herkunft
293	Humane embryonale Nierenzellen	DSMZ (Braunschweig, Deutschland)
293T	Humane embryonale Nierenzellen, Tragen das SV40 T-Antigen	DSMZ (Braunschweig, Deutschland)
293T Phoenix-Eco	Humane embryonale Nierenzellen, Tragen das Adenovirus E1a und ein T-Antigen	DSMZ (Braunschweig, Deutschland)
Ba/F3	Maus Pro B-Zellen	DSMZ (Braunschweig, Deutschland)
BWZ.36	Maus T-Zell-Lymphomzellen (AKR), mit b-Galaktosidasereporterträger	N. Shastri (Berkeley, USA)
BWN.3G	Maus T-Lymphomzellen mit eGFP-Reporterträger	Lise Kveberg (Oslo, Norwegen)
C1R	Humane lymphoblastoide B-Zellen	DSMZ (Braunschweig, Deutschland)
CHO	Zellen aus Ovarien des Chinesischen Zwerghamsters	DSMZ (Braunschweig, Deutschland)
COS7	Nierenzellen der Äthiopischen Grünmeerkatze, tragen das SV40 T-Antigen	DSMZ (Braunschweig, Deutschland)
EL4	Maus T-Lymphozyten	DSMZ

		(Braunschweig, Deutschland)
HuT78	Humane kutane T-Lymphozyten	DSMZ (Braunschweig, Deutschland)
Jurkat	Humane T-Lymphozyten	DSMZ (Braunschweig, Deutschland)
MEF	Maus embryonale Fibroblasten	DSMZ (Braunschweig, Deutschland)
NK92MI	Humane NK-Zellen	DSMZ (Braunschweig, Deutschland)
P3x63Ag8.653	Maus B-Lymphoblasten	DSMZ (Braunschweig, Deutschland)
P815	Maus Mastzellen	DSMZ (Braunschweig, Deutschland)
RAW309	Maus Monozyten/Makrophagen	DSMZ (Braunschweig, Deutschland)
RMA	Maus Lymphoma-Tumorzelllinie	DSMZ (Braunschweig, Deutschland)
RMA-S	Maus Lymphoma-Tumorzelllinie	DSMZ (Braunschweig, Deutschland)
SP2/0	Maus B-Lymphozyten	DSMZ (Braunschweig, Deutschland)

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Isolierung von RNA

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Zelllinien, primären Geweben und primären Zellen erfolgte unter Verwendung von peqGOLD TriFast mithilfe einer optimierten Guanidinisothiocyanat/Phenol-Methode. Abhängig davon ob Zellen oder Gewebe homogenisiert werden sollte, erfolgte die Homogenisierung unter Zugabe von 1-3 ml TriFast. Das aufzuschließende Gewebe/Zellen wurden entweder in der phenolhaltigen Homogenisierungslösung für 10 min inkubiert oder mithilfe eines GentleMACS™ Dissociators unter Verwendung eines RNA-Programms (Programm 1 für frische Proben, Program 2 für eingefrorene Proben) mechanisch aufgeschlossen. Für letztere wurden die Gewebe im GentleMACS™ M-Röhrchen in 1-3 ml TriFAST aufgenommen. Zuvor wurden die Zellen zweimal in eiskaltem PBS (1x) gewaschen. Gewebe wurden ebenfalls in PBS (1x) gespült. Zugabe von 200 µl Chloroform auf 1 ml TriFast, mehrmaliges Invertieren und Zentrifugation für 15 min bei 4 °C und 12000xg diente der anschließenden dreischichtigen Phasentrennung. In der oberen wässrigen Phase ist die RNA vorzufinden, die untere Phenol-Chloroform-Phase und die mittlere Interphase enthalten DNA und Proteine. Etwa 70 % der oberen RNA-haltigen Phase wurden abgenommen und die RNA durch Zugabe von 200 µl Chloroform extrahiert. Zur Fällung der RNA wurden 500 µl Isopropanol hinzugegeben und die Probe für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die RNA wurde durch 15 min Zentrifugation pelletiert bei 4°C und 12000xg und anschließend mit 800 µl 75 %igem Ethanol gewaschen. Nach dem nächsten Zentrifugationsschritt wurde das RNA-Pellet unter dem Luftstrom einer Werkbank getrocknet und in 30-200 µl RNase freiem Wasser aufgenommen. Die Langzeitlagerung erfolgte bei -80°C. Alle Schritte der RNA-Isolation erfolgten in einem separaten für RNA-Arbeiten vorgesehenen Raum. Die verwendeten Reagenzien und Materialien waren alle frei von RNAsen.

3.1.2 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Zur Konzentrationsbestimmung von RNA und DNA wurde das Nanophotometer-UV/VIS-Spektralphotometer der Firma IMPLEN verwendet. Anhand des Absorptionsmaximums von Nukleinsäuren bei 260 nm (A_{260}) und des Extinktionskoeffizienten für RNA bzw. DNA wurde die Konzentration bestimmt. Anhand des Quotienten A_{260}/A_{280} konnte die Probe auf eventuelle Proteinverunreinigungen geprüft werden. Bei einer reinen RNA-Probe liegt der Quotient bei 2, bei reinen DNA-Proben im Optimalfall bei 1,8. Bei 280 nm liegt das Absorptionsmaximum von aromatischen Aminosäureresten.

1.1.1. DNase Verdau von RNA

Zur Entfernung von restlichen DNA-Kontaminationen aus einer präparierten RNA-Probe wurde die Probe mit RNase-freier DNaseI behandelt. DNaseI ist eine Endonuklease, die Doppel- und Einzelstrang DNA in Oligo- und Mononukleotide hydrolysiert. Hierfür wurde zu 1 µg RNA 1 U DNaseI und 1 µl 10x DNase Puffer (Gesamtvolumen 10 µl) hinzugegeben und die Probe für 45 min bei 37°C im Thermocycler inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 µl DNaseI Stop-Puffer durch Inkubation für 5 min bei 65°C gestoppt. Dieser Inkubationsschritt führt zur Denaturierung der RNA, die anschließend direkt zur cDNA-Synthese eingesetzt wurde.

3.1.3 cDNA-Synthese

Zur Synthese von cDNA wurde zu den 11 µl DNase-behandeltem RNA-Ansatz 2 µl dNTPs (10 mM), 2,4 µl zufällig angeordnete Hexadesoxynukleotide (Random-Oligonukleotide, Stammlösung 100 ng/µl) sowie 14 µl RNase-freies Wasser dazugegeben. Zur Auflösung der RNA-Sekundärstruktur und Anlagerung der Random-Oligonukleotide wurde der Ansatz 5 min bei 65°C inkubiert. Anschließend wurden zum Ansatz 8 µl 5x M-MLV-Puffer und 20 U RNasin (0,5 µl, RNase Inhibitor) hinzugegeben und die Probe für 2 min bei RT inkubiert. Der Ansatz wurde halbiert und zu einem Ansatz 1 µl M-MLV Transkriptase (+RT), zum anderen Ansatz 1 µl Wasser (-RT) pipettiert. Die Herstellung der cDNA erfolgte im Thermocycler unter Verwendung des in Tabelle 20 aufgeführten Programmes. In der quantitativen Echtzeit-PCR wurden 1 µl der cDNA-Lösung eingesetzt. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20°C.

Tabelle 21: cDNA-Synthese – Programm Thermocycler

	Temperatur (°C)	Zeit (min)
1. Vorlauf	25	10
2. Synthese	42	50
3. Inaktivierung M-MLV Transkriptase	70	15
	4	gehalten

3.1.4 Quantitative Echtzeit-PCR

Mithilfe der quantitativen Echtzeit-PCR (engl. real-time (RT)-PCR) kann die cDNA nach Vervielfältigung präzise, effizient und schnell unter Nutzen eines fluoreszenten Reporters detektiert und quantifiziert werden. Anders als bei der Endpunktbestimmung, bei der die Menge an PCR-Produkten erst am Ende der Reaktion bestimmt werden kann, wird hier in der exponentiellen Phase der Reaktion die Menge

an Produkten in Echtzeit verfolgt. In dieser Arbeit wurde zur Detektion SYBR-Green I verwendet. Der interkalierende Fluoreszenzfarbstoff lagert sich an die DNA an, der DNA-SYBR-Green I-Komplex absorbiert blaues Licht bei einer Wellenlänge von 494 nm und emittiert grünes Licht bei einer Wellenlänge von 521 nm. Für den RT-PCR Ansatz wurden pro Ansatz ein Mix vorbereitet (20 µl) aus RNase-freiem Wasser, dem entsprechendem Forward- und Reverse- Primer (200-300 nM) und dem FastStart Universal SYBR-Green Master Mix (1x). Der FastStart Universal SYBR-Green Master Mix enthält den SYBR-Green I Farbstoff, die FastStart Taq DNA Polymerase, dNTPs und eine passive Referenzkontrolle (ROX-Farbstoff). Die Ansätze wurden in einer für die RT-PCR speziellen 96-Loch-Platte verteilt. Die +RT wurde in Triplikaten, die –RT in Unikaten verteilt. Hinzu wurden jeweils 5 µl an cDNA pipettiert. Nach der cDNA-Synthese (Abschnitt 3.1.3) wurde die cDNA 1:5 bis 1:50 verdünnt, sodass die exponentielle Phase der Kontrollen jeweils bei einem ähnlichen C_t-Wert startete. Dies entsprach einer cDNA Menge von 25 ng pro Well. Anschließend wurde die Platte mit einer Thermocycler-Folie verschlossen und die Proben im Thermocycler inkubiert. Tabelle 21 listet das Programm, welches zur Amplifizierung im Thermocycler genutzt wurde.

Tabelle 22: Programm Thermocycler – quantitative Echtzeit-PCR

Phase	Temperatur (°C)	Zeit	Zyklus
Vorlauf	50	2 min	1x
Aktivierung	95	10 min	1x
Denaturierung	95	15 sec	} 40x
Anlagerung/ Extension	60	60 sec	
Schmelzkurve	95	15 sec	1x
	60	20 sec	1x
	95	15 sec	1x

3.1.5 Mutagenese – Restriktionsfreie Klonierung mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die restriktionsfreie Klonierung wurde nach (van den Ent & Löwe, 2006) durchgeführt. In einem ersten Amplifizierungsschritt wurde das Zielgen aus einem Ursprungsvektor amplifiziert. Anschließend wurde dieses PCR-Produkt als Mega-Primer in einer linearen Amplifizierungsreaktion in das gewünschte zirkuläre Zielplasmid eingebracht. Der gesamte Ansatz wurde mit 1 µl DpnI (20 U) bei 37°C für 1 h behandelt. Zur Transformation wurden 1-4 µl Ansatz eingesetzt.

Tabelle 23: Ansatz PCR1 – Amplifizierung Zielgen

Reagenz	Konzentration
PhusionHF-Puffer	1x
dNTP	200 µM
Primer (vorwärts)	0,2 µM
Primer (rückwärts)	0,2 µM
Phusion Polymerase	1 U/ 50 µl
Plasmid	10 ng/50 µl
→ auf 50 µl mit Nuklease-freiem Wasser auffüllen	

Tabelle 24: Programm PCR1 – Amplifizierung Zielgen

Zyklen	Temperatur (°C)	Zeit
1x	98	30 s
30x	98	10 s
	68	30 s
	68	30 s pro kb
1x	72	10 min
	8	Lagerung bis Stop

Tabelle 25: Ansatz PCR 2 – Mutagenese mittels Mega-Primer

Reagenz	Konzentration
PhusionHF-Puffer	1x
dNTP	200 µM
DMSO	3 %
Mega-Primer (= PCR-Produkt aus Schritt 1)	200-300 ng/50 µl
Phusion Polymerase	1 U/ 50 µl
Plasmid	30 ng/50 µl
→ auf 50 µl mit Nuklease-freiem Wasser auffüllen	

Tabelle 26: Programm PCR2 – Mutagenese mittels Mega-Primer

Zyklen	Temperatur (°C)	Zeit
1x	98	30 s
20x	98	10 s
	68	30 s
	68	30 s pro kb
1x	72	10 min
	8	Lagerung bis Stop

3.1.6 Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau mit Endonukleasen wurde während eines Klonierungsprozesses oder zur analytischen Überprüfung einer bereits klonierten Plasmid-DNA verwendet. Der analytische Restriktionsverdau erfolgte für 2-3 h bei 37°C im Wasserbad. Dabei wurden 2 µg Plasmid-DNA mit 5-10 U Restriktionsenzym in einem Gesamtvolumen von 20 µl unter Zugabe des für das Enzym vorgesehenen Puffers (1x) und Wasser gespalten. Der Verdau wurde mittels DNA-Gelelektrophorese nach Laden von 200-300 ng DNA im Vergleich zur unbehandelten Probe überprüft.

Für einen präparativen Verdau wurden 5 µg Plasmid-DNA oder 30 µl Eluat bei PCR-Produkten nach Reinigung mittels Gelextraktion in Anwesenheit des jeweiligen Puffers (1x) mit 10-20 U Restriktionsenzym in einem Gesamtansatz von 15-40 µl verdaut. Je nach Enzym wurde der Ansatz mit BSA (0,1 µg/µl) versetzt. Der Verdau erfolgte mindestens 3 h oder über Nacht bei 37 °C. Nach Spaltung von Plasmid-DNA wurde diese anschließend mit 5 U SAP (shrimp alkaline phosphatase) behandelt, um eine Religation zu verhindern. Die verdaute Plasmid-DNA wurde elektrophoretisch aufgetrennt, aufgereinigt und die Konzentration ermittelt. Gespaltene PCR-Produkte wurden ebenfalls aufgereinigt und die Konzentration bestimmt.

3.1.7 Ligation

Nach Spaltung und Reinigung des Vektors und des zu inserierenden DNA-Abschnittes (Insert) wurden beide DNA-Fragmente ligiert. Hierzu wurden T4-DNA-Ligasen verwendet. Ligasen verknüpfen die 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatgruppen benachbarter Nukleotide unter Verbrauch von ATP. Das molare Verhältnis von Insert zu Vektor betrug 3:1 sowie 5:1. Dabei wurden 25-100 ng an Vektor pro Ligationsansatz verwendet und die entsprechende Menge an Insert anhand folgender Formel berechnet:

$$\text{Verhältnis Z:1} \rightarrow \text{Menge Insert (ng)} = Z \times (\text{Menge Vektor (ng)} \times \text{bp Insert}) / \text{bp Vektor}$$

In einem Gesamtvolumen von 20 µl wurde das Vektor-Insert-Gemisch mit T4-DNA-Ligase und T4-DNA-Ligasepuffer (1x) versehen und 2 h bei RT oder 3 h bis hin zu über Nacht bei 4 °C ligiert. Zur anschließenden Transformation in chemisch kompetente E. coli wurden 1-5 µl des Ligationsansatzes verwendet.

3.1.8 Linearisierung und Fällung von DNA

Die Linearisierung von Plasmid-DNA wurde vorwiegend für die stabile Transfektion von Zellen vorgenommen. Dabei wurden pro Ansatz 20 µg Plasmid-DNA mit 5 U Restriktionsenzym pro µg eingesetzter DNA in einem Gesamtvolumen von 100 µl über Nacht bei 37 °C im Wasserbad gespalten. Der jeweils zu verwendende Restriktionspuffer wurde 1x eingesetzt. In der Regel wurden 40 µg Plasmid-DNA verdaut. Anschließend wurde das Restriktionsenzym nach Herstellerangaben hitzeinaktiviert und die Plasmid-DNA gefällt. Die Fällung erfolgte mit 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat und 2,5 Volumen Ethanol für 2-8 h bei -20 °C. Anschließend wurde die DNA in der Tischzentrifuge pelletiert (13000 rpm, 15 min, 4 °C) und nach Waschen mit 70 %-igem eiskaltem Ethanol (13000 rpm, 15 min, 4 °C) in Nuklease-freiem Wasser aufgenommen. Die Linearisierung wurde mittels Agarose Gelelektrophorese überprüft.

3.1.9 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Analyse, Trennung und präparativen Aufarbeitung von DNA-Fragmenten. Dabei wandern die negativ geladenen DNA-Moleküle in einem elektrischen Feld durch eine Gelmatrix zur positiv geladenen Anode und werden nach ihrer Molekülgröße getrennt. Ein Vergleich mit einem geeigneten Größenstandard dient der Bestimmung der Molekülgröße. Je nach Größe der zu analysierenden DNA-Moleküle wurden 1-3 % Agarose in TAE-Puffer durch Kochen gelöst. Nach kurzem Abkühlen wurde das Gel mit einer 0,07 %igen Ethidiumbromidlösung versetzt (100 µl auf 50 ml) und in Flachbettkammern gegossen. Zur Bildung der Beladungstaschen wurde ein Kamm in die Vorrichtung eingebracht. Nach Polymerisierung des Gels wurde dieses in die mit TAE-Puffer beladenen Elektrophoresekammern gesetzt, die Kämme entfernt und die DNA-Proben in die Taschen geladen. Die DNA-Proben wurden mit Orange G-Ladepuffer (1x) versetzt, um den Auftrennungsprozess zu visualisieren. Abhängig von der Anzahl der Kämme erfolgte die elektrophoretische Auftrennung für 30-60 min bei 120 V. Anschließend konnten die aufgetrennten DNA-Moleküle anhand des interkalierenden Ethidiumbromids in einer UV-Dokumentationsanlage visualisiert und gegebenenfalls auf einem UV-Dokumentationstisch aus dem Agarosegel ausgeschnitten werden.

3.1.10 Reinigung von DNA-Fragmenten

Die Reinigung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel erfolgte unter Verwendung des QIAquick Gelextraktions Kits (Qiagen). Hierzu wurden die zu aufreinigenden DNA-Fragmente mit einem Skalpell auf einem UV-Tisch aus dem Agarosegel ausgeschnitten und anschließend gewogen, um das Gel im ersten Schritt in dem entsprechenden Volumen an Kit QG-Puffer aufzulösen. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Die Elution erfolgte in 30 µl Kit-Elutionspuffer.

Nach einer Behandlung mit Restriktionsenzymen wurde zum Entfernen der Salze und Puffer das QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) verwendet. Die Reinigung erfolgte nach Herstellerangaben. Die Elution der DNA-Fragmente von der Säule erfolgte mit 30 µl Kit Elutionspuffer.

3.1.11 Transformation von E. coli

Transformation bezeichnet das Einschleusen von fremder DNA in Bakterien. Es wurden chemisch kompetente E. coli des Stammes Top10 oder DH5 α verwendet. Zur Transformation wurden pro Ansatz 50 µl Bakterien auf Eis aufgetaut und mit 1 µl, 2 µl oder 5 µl PCR-Ansatz nach Mutagenese, 1-5 µl Ligationsansatz oder 10-20 ng Plasmid-DNA bei einer Retransformation versetzt. Nach einer 20 min langer Inkubation auf Eis wurden die Bakterien bei 42 °C je nach Bakterienstamm 45-90 s mit einem Hitzeschock behandelt und direkt im Anschluß 2 min auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 1 ml vorgewärmten LB-Medium oder SOC-Medium (37 °C) wurden die Bakterien 1 h bei 37 °C und 220 rpm im Bakterienschüttler inkubiert.

3.1.12 Kolonie-PCR

Zur Überprüfung mehrerer über Nacht kultivierter Bakterienklone nach Transformation auf die Präsenz von inserierten DNA-Fragmenten oder Mutationen in der Plasmid-DNA wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Hierfür wurde mit einer 200 µl Pipettenspitze in die Bakterienklone gepickt und diese anschließend in 25 µl einer angesetzten PCR-Lösung (Ansatz Tabelle 26) getaucht. Mit der gleichen Spitze wurden 3 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum für eine Plasmidpräparation angeimpft. Durch Verwendung geeigneter Oligonukleotide (Primer) wurde die gewünschte DNA-Sequenz in einer PCR-Reaktion (Tabelle 27) bestehend aus 30 Zyklen im Thermocycler amplifiziert und die Länge der DNA-Sequenz nach elektrophoretischer Auftrennung im DNA-Agarosegel überprüft. Im ersten Schritt der PCR-Reaktion (Denaturierung) werden die Bakterien aufgeschlossen, sodass die DNA zugänglich ist. Positive Klone der zuvor angeimpften Bakterienkulturen wurden über Nacht bei 37 °C und 230 rpm im Bakterienschüttler kultiviert.

Tabelle 27: Ansatz Kolonie-PCR

Reagenz	Konzentration
ThermoPol-Puffer	1x
dNTP	200 µM
Primer (vorwärts)	0,2 µM
Primer (rückwärts)	0,2 µM
Taq DNA Polymerase	1,25 U/ 50 µl
Klon als DNA-Matrize	
→ auf 25 µl mit Nuklease-freiem Wasser auffüllen	

Tabelle 28: Programm Kolonie-PCR

Zyklen	Temperatur (°C)	Zeit
1x	95	30 s
30x	95	30 s
	60	1 min
	68	1 min pro kb
1x	68	5 min
	8	Lagerung bis Stop

3.1.13 Plasmidpräparation

Zur Isolation bakterieller Plasmid-DNA wurde nach Animpfen von 2-3 ml Antibiotika-haltigem LB-Medium mit Bakterien das Mini Plasmid-Kit EasyPrep Pro und nach Animpfen von 100-300 ml LB-Medium ein Plasmid Midi oder Plasmid Maxi Kit (Qiagen) verwendet. Die Kultivierung der Bakterien erfolgte im Bakterienschüttler über Nacht bei 37 °C und 200-230 rpm. Die Plasmidpräparation erfolgte nach den jeweiligen Herstellerangaben. Nach einer Präparation im Mini-Format wurde das gereinigte Plasmid mit 30 µl des im Kit vorliegenden Elutionspuffers eluiert. Nach Präparation im Mini/Midi-Format wurde das Plasmid-Pellet in 100-300 µl Nuklease-freiem Wasser aufgenommen. Die erfolgreiche Insertion von DNA-Fragmenten oder Mutation wurde durch Sequenzierung mit geeigneten Oligonukleotiden überprüft. Die Sequenzierung wurde durch die Firma SeqLab (Göttingen, Deutschland) durchgeführt. Die Lagerung der Plasmide erfolgte bei -20 °C.

3.1.14 Kryokonservierung von E. coli

Zur Langzeitlagerung transformierter E. coli wurden 850 µl der Übernacht kultivierten Bakterien mit 150 µl autoklaviertem Glycerol (100 %) versetzt und bei -80 °C gelagert. Das Glycerol wird in die Zelle eingelagert und verdrängt das Wasser, welches ansonsten zur Kristallbildung und somit zum Zerstören der Zelle führen könnte.

3.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.1 Proteinreinigung

3.2.1.1 Metallchelate-Affinitätschromatografie

Die Reinigung von löslichen 6xHis-markierten Clr-a Ektodomänen, welche zur Antikörperherstellung genutzt wurden, erfolgte mittels Immobilisierter-Metallionen-Affinitätschromatografie (engl. immobilized metal ion affinity chromatography = IMAC). Dieses Verfahren beruht auf der starken Affinität des Histidins für Metallionen. Die Reinigung erfolgte unter Verwendung einer 1 ml Ni²⁺-NTA-Säule (HisTrap™ FF) im vollautomatisierten Äkta-Purifier-System. Der zu aufreinigende Zellkulturüberstand wurde 1:1 mit Bindepuffer versetzt, steril filtriert und mittels Auftragspumpe (1-3 ml/min) auf die Säule aufgetragen. Zuvor wurde die Säule mit 5 Säulenvolumen (engl. CV = column volume) Bindepuffer (1 ml/min) äquilibriert. Nach dem Probenauftrag wurde die Säule mit 10 CV Bindepuffer gewaschen. Der Durchfluss wurde gesammelt, um das restliche nicht-gebundene lösliche Protein in weiteren Reinigungsprozessen vollständig aus dem Zellkulturüberstand zu reinigen. Die Elution erfolgte zunächst mit 10 % (50 mM Imidazol, 5 CV, 1 ml/min) und anschließend mit 35 % (175 mM Imidazol, 10 CV, 1 ml/min) Elutionspuffer und die einzelnen Elutionsfraktionen (1,5 ml) wurden automatisiert in 15 ml Falcons gesammelt. Anschließend wurde die Säule mit 5 CV 100 % (500 mM Imidazol) Elutionspuffer regeneriert. Der Verfolgung und Auswertung des Reinigungsverlaufs erfolgte durch die Unicorn Software. Die Protein-enthaltenden Fraktionen wurden vereint und anschließend mittels Ultrazentrifugation einkonzentriert.

3.2.1.2 Fc Fusionsproteine über Protein A Sepharose – Protein A Chromatografie

Die Reinigung der humanen IgG1 Fc Fusionsproteine erfolgte bei 4°C mittels Affinitätschromatographie unter Verwendung einer Protein A beladenen Gelmatrix. Der Zellüberstand wurde in einem Verhältnis von 1:2 mit Bindepuffer versetzt, über einen 0,22 µm Filter steril filtriert und anschließend manuell auf eine Säule mit einem Protein A-Sepharose Säulenvolumen (SV) von 5 ml geladen. Zuvor wurde die Säule mit einem 5-fachem SV an Fc-Bindepuffer (pH 7,0) äquilibriert. Nach zweimaligem Waschen der Säule mit jeweils 20 ml Fc-Bindepuffer wurden die humanen IgG1 Fc Fusionsproteine mit 10 ml Fc-Elutionspuffer (pH 2,7) eluiert. Zur Neutralisierung des pH-Wertes des Eluates wurde in die 15 ml Falcons, in denen die Probe eluiert wurde, 4 ml HEPES Puffer (pH 9,0) vorgelegt. Abschließend wurde die Säule zweimal mit 20 ml Bindepuffer gewaschen. Die eluierten Proben wurden mittels Ultrafiltration gegen PBS umgepuffert und einkonzentriert.

3.2.1.3 Reinigung Antikörper über Protein G Säulen – Protein G Chromatografie

Die aus der Ratte gewonnenen Clr-a Antikörper (Klon 2E3) wurden mittels Affinitätschromatographie unter Verwendung von 1 ml Protein G Säulen in einem vollautomatisierten Äkta-Purifier-System gereinigt. Die Säule wurde mit 5 SV Protein G-Bindepuffer äquilibriert und die Proteinprobe, die zuvor über Nacht gegen Protein G-Bindepuffer dialysiert wurde, anschließend mit 1-2 ml/min auf die Säule aufgetragen. Nach einem Waschschrift mit 10 SV Protein G-Bindepuffer wurden die gebundenen Proteine mit Protein-G Elutionspuffer (0,1 M Glycin-HCl, pH 2,7) von der Säule eluiert. Das Eluat wurde in einem Volumen von 1-2 ml pro Falcon, welches zur Neutralisierung der Proteinlösung 200-400 µl 1 M Tris-HCl (pH 9,0) enthielt, fraktioniert. Die entsprechenden Fraktionen wurden gepoolt und über Nacht gegen PBS dialysiert.

3.2.1.4 Größenausschlusschromatografie

Die Größenausschlusschromatographie dient der Trennung von Molekülen nach ihrer Größe und wurde in dieser Arbeit als zweiter Reinigungsschritt zur Reinigung der löslichen 6xHis-markierten Clr-a Ektodomänen nach der Metallchelate-affinitätschromatographie verwendet. Die Reinigung erfolgte vollautomatisiert in einem Äkta-Purifier-System unter Verwendung einer HiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade Säule. Die in Ethanol gelagerte Säule wurde zunächst mit Wasser gewaschen und die Äquilibration erfolgte mit 1 SV 1x PBS. Die Proteinprobe wurde nach manueller Injektion durch Spülen des Loop-Injektions-Systems mit 1x PBS auf die Säule geladen und mit 1,2 SV PBS mit einer Flussrate von 1 ml/min eluiert. Die entsprechenden Proteinfractionen wurden vereint und mittels Ultrazentrifugation konzentriert. Der Reinigungsprozess wurde mithilfe der Software Unicorn verfolgt und ausgewertet.

3.2.2 Ultrafiltration von Proteinen

Die Umpufferung und Konzentrierung von gereinigten löslichen Clr-a Ektodomänen, humanen IgG1 Fc Fusionsproteinen und Ratten Clr-a Antikörpern erfolgte mittels Ultrazentrifugation. Es wurden Amicon Ultra-4 oder Ultra-15 Zentrifugen Filtereinheiten verwendet mit einem Molekulargewicht Ausschlussgrenze von 30,000 Dalton. Die Filter wurden zunächst mit PBS äquilibriert, die gesammelten Proteinfractionen nach der Reinigung auf den Filter gegeben und in einer Ausschwingrotor-Zentrifuge 15-30 min bei 4°C zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die konzentrierte Proteinlösung zur Umpufferung erneut mit PBS aufgefüllt und zentrifugiert. Dieser Schritt wurde insgesamt 2-3 Mal wiederholt. Die Proteinlösung wurde auf ein Endvolumen von etwa 500 µl (Ultra-15) bzw. 100 µl (Ultra-4) konzentriert und die Proteinkonzentration unter Verwendung des Nanophotometers bestimmt.

3.2.3 Herstellung von Proteinlysaten

Zur Herstellung von Proteinlysaten aus Zelllinien oder isolierten Zellen aus Maus Primärgewebe wurden die pelletierten mit eiskaltem PBS gewaschenen Zellen in NP-40 Lysepuffer (Zelllinien) oder RIPA-Puffer (Primärgewebe) aufgenommen. Der NP-40 Lysepuffer wurde zuvor mit „mini cOmplete“ Proteaseinhibitoren versetzt. Die Zentrifugation erfolgte bei Zelllinien 3 min bei 1600 rpm (4°C) und bei primären Zellen 10 min bei 400 x g (4°C). Die Zellen wurden resuspendiert und die Lyse erfolgte durch Inkubation für 30 min auf Eis mit mehrmaligem Vortexen. Anschließend wurde durch Zentrifugation bei 13000 rpm für 15 min bei 4°C der Zellschrott pelletiert und die gewonnene Proteinlösung in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Die Proteinkonzentration wurde mittels Bradford ermittelt.

Zur Herstellung von Proteinlysaten aus intestinale Gewebe nach Behandlung der Mäuse mit PBS oder Poly(I:C) wurde ein Teil des frischen Gewebes in ein gentleMACS™ M-Röhrchen überführt. Nach Zugabe von 1-2 ml RIPA-Puffer wurden die Zellen im gentleMACS™ Dissociator aufgeschlossen. Die anschließende Zentrifugation erfolgte für 5 min bei 4000 x g. Die Proteinkonzentration der Proteinlösung wurde mittels Bradford ermittelt.

Die Proteinlysate wurden entweder direkt im Experiment eingesetzt oder bei -20 °C gelagert.

3.2.4 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Bestimmung der Proteinkonzentration von Proteinlysaten erfolgte mittels Bradford-Methode unter Verwendung des Coomassie® Brilliant Blue G250 Farbstoffes. Die Bindung an aromatische und basische Aminosäuren in Proteinen führt zur Verschiebung des Coomassie®-Absorptionsmaximums von 470 nm nach 595 nm im sauren Medium. Die Proteinlysate wurden in einer Küvette 1:500 in PBS verdünnt und mit 500 µl Roti-Nanoquant Lösung gemischt. Diese enthielt 40 % Roti-Nanoquant in PBS. Anschließend wurde die Absorption spektralphotometrisch bei 595 nm gemessen, nachdem die Absorption einer Protein-freien Roti-Nanoquant Lösung subtrahiert wurde. Eine BSA Kalibrierungsgerade wurde als Referenz zur quantitativen Bestimmung der Proteinkonzentration herangezogen.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration von gereinigten Proteinen erfolgte durch spektralphotometrische Messung der Proteinlösung bei 280 nm. Anschließend wurde die Proteinkonzentration unter Verwendung des Lambert Beer'sches Gesetzes berechnet. Der Extinktionskoeffizient ($M^{-1}cm^{-1}$) wurde mithilfe des Programs ProtParam auf dem ExPASy Proteomics Server ermittelt. Die berechnete Proteinkonzentration wurde durch Analyse von 1-2 µg des

gereinigten Proteins in der SDS-PAGE mit einer BSA-Standardreihe (0,5- 4 µg) als Referenzprotein analysiert.

Lambert Beer'sches Gesetz: $A_{280\text{ nm}} = \epsilon \times d \times c$

3.2.5 Immunpräzipitation

Mittels Immunpräzipitation können spezifische Proteine aus Lysaten unter Verwendung der Antigen-Antikörper Interaktion isoliert werden. Hierbei wurden je Probe 25 µl magnetische Protein A/G Kügelchen verwendet. Die Kügelchen wurden unter Verwendung eines Magneten 2x mit je 1 ml PBST gewaschen, anschließend in 1 ml PBST aufgenommen und der Antikörper hinzupipettiert (siehe Tabelle 28).

Tabelle 29: Antikörper-Konzentrationen in der Immunpräzipitation

Antikörper	eingesetzte Menge/Probe
Clr-a 2E3	10 µg
Clr-f 10A6	10 µg
Clr-a/Clr-f 3C7	25 µl Hybridomüberstand
FLAG M2	3 µg
Isotyp Ratten IgG2a	10 µg
Isotyp Ratten IgG2b	10 µg

Nach Rotieren über Nacht bei 4°C wurden die Kügelchen 2x mit PBS gewaschen und 1 ml Lysat hinzugegeben. Die Präzipitation erfolgte unter Rotieren bei 4°C über Nacht. Es wurden 1×10^7 Zellen pro Probe eingesetzt. Am nächsten Tag wurden die Kügelchen 5x in PBST und 2x in Lysepuffer NP40 (je 1 ml) gewaschen, in 20 µl Lämmli-Puffer (2x, + β-Mercaptoethanol) aufgenommen und 5 min bei 95°C aufgeköcht. Die Kügelchen wurden am Magneten gesammelt und der Überstand in einer SDS-Gelelektrophorese und anschließendem Immunoblot analysiert. Zur Kontrolle wurden zudem 2 % des Lysats im SDS-Gel aufgetragen.

3.2.6 PNGaseF Behandlung von Proteinen

Die Peptid-N-Glykosidase F (PNGaseF) ist eine Amidase, die zwischen den GlcNAc und Asparagineinheiten komplexer N-verknüpfter Glykoproteine spaltet. Insgesamt wurden 18 µl Zelllysat mit 1x Denaturierungspuffer versetzt und für 10 min bei 95°C inkubiert. Nach kurzer Abkühlung wurden 2,5 µl G7-Puffer, 2,5 µl 10% NP40-Puffer und 0,5 µl PNGaseF (25 U) hinzugegeben. Der Verdau

erfolgte für 2 h bei 37 °C im Wasserbad. Für größere Proteinmengen wurde der Ansatz in einem Gesamtvolumen von 35 µl entsprechend angepasst.

3.2.7 EndoH Behandlung von Proteinen

EndoglykosidaseH (EndoH) spaltet innerhalb der GlcNAc-GlcNAc Einheit von Hochmannose- und Hybrid-Oligosacchariden N-verknüpfter Glykoproteine, welche noch nicht durch die α -Mannosidase II im medialen Golgi-Apparat modifiziert und diesen somit passiert haben. Die Zelllysate wurden wie unter 1.6 beschrieben mittels Denaturierungspuffer behandelt. Der Verdau erfolgte für 2 h bei 37°C nach Zugabe von 2,5 µl G5-Puffer, 1 µl EndoH (50 U) und 1,5 µl PBS, um auf ein Gesamtvolumen von 25 µl zu kommen. Für größere Proteinmengen wurde der Ansatz in einem Gesamtvolumen von 35 µl entsprechend angepasst.

3.2.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe. Anhand des Vergleichs der aufgetrennten Proteine mit einem geeigneten Größenstandard kann auf das Molekulargewicht von Proteinen geschlossen werden. Die Auftrennung erfolgte in einem SDS-Tris-Glycin-Puffersystem unter Verwendung selbst hergestellter oder gekaufter SDS-Gele, bestehend aus einem Sammel- und einem Trenngel. Die Zusammensetzung ist in Tabelle 29 und 30 aufgelistet. Die Migration der Proteine im Polyacrylamid-Gel wird durch die Zugabe des Detergenz SDS bewirkt. Dadurch erhalten die Proteine eine negative Ladung und wandern im elektrischen Feld des Elektrophoresesystems in Richtung Anode.

Die Zelllysate oder rekombinanten Proteine wurden mit reduzierendem (β -Mercaptoethanol-haltigem) oder nicht reduzierendem SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95°C aufgeköcht. Dies diente der Denaturierung der Proteine und Aufspaltung von Disulfidbrücken. In einem Gesamtvolumen von bis zu 32 µl wurden 2 µg (rekombinante Proteine) bis 400 µg (Zelllysate) Protein pro Geltasche aufgetragen. Vom Größenstandard wurden 4 µl pro Geltasche geladen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei einer konstanten Spannung von 100-160 Volt. Anschließend wurden die SDS-Gele direkt im Immunoblotting eingesetzt oder zur Visualisierung der Proteine mit einer Coomassie-haltigen Lösung (InstantBlue™) gefärbt.

Tabelle 30: Zusammensetzung der SDS-Trenngele (12 %, 10 %, 8 %, Angaben für zwei Gele)

Reagenz	Volumen (µl) 15 %	Volumen (µl) 12 %	Volumen (µl) 10 %	Volumen (µl) 8 %
ddH ₂ O	5400	6600	7200	8000
Puffer (1,5 M Tris-HCl, pH 8,6)	3800	3800	3800	3800
Acrylamid (40%)	5600	4600	3800	3000
SDS (10 %)	150	150	150	150
APS (10 %)	150	150	150	150
TEMED	20	20	20	20

Tabelle 31: Zusammensetzung des SDS-Sammelgels (4,5 %, Angaben für zwei Gele)

Reagenz	Volumen (µl)
ddH ₂ O	3800
Puffer (1 M Tris-Base, HCl pH 6,8)	600
Acrylamid (40%)	600
SDS (10 %)	50
APS (10 %)	50
TEMED	7,6

3.2.9 Silberfärbung von SDS-Gelen

Die Silberfärbung ist eine sehr sensitive Färbemethode, mit welcher Proteinmengen von 50 bis 100 pg pro Bande nachgewiesen werden können (Heukeshoven & Dernick, 1988; Merrill, Goldman, Sedman, & Ebert, 1981). Bei der Silberfärbung bildet das Ag⁺-Ion Komplexe mit den Glu-, Asp- und Cys-Resten der Proteine. Alkalisches Formaldehyd reduziert das Ag⁺ der Komplexe zu Ag. Die Silberfärbung ist nicht spezifisch für Proteine und färbt auch Nukleinsäuren, Lipopolysaccharide, Lipide und Glykolipide (Rehm & Letzel, 2009). Zur Silberfärbung wurde das SDS-Gel in eine Gelfärbeschale gelegt und mit ddH₂O abgespült. Anschließend erfolgten die folgenden Inkubationsschritte, die alle auf dem Horizontalschüttler bei RT durchgeführt wurden. Hierzu wurde das SilverXpress® Silver Staining Kit (Invitrogen) verwendet. Das SDS-Gel wurde für 15 min in 50 ml Fixierlösung inkubiert und anschließend für 10 min in der Waschlösung gewaschen. Nach Abschütten der Waschlösung erfolgte die Inkubation für 10 min in 50 ml Sensibilisierungslösung. Nach einem weiteren 10-minütigen Waschschrift in der Waschlösung wurde das Gel für 10 min in ddH₂O gewaschen. Nach Inkubation in 50 ml Färbelösung für 15 min wurde das Gel für 60 Sekunden mit ddH₂O gewaschen. Zuletzt wurde das Gel in der

Entwicklerlösung inkubiert und die Reaktion nach Erreichen der gewünschten Bandenintensität durch Zugabe von 5 ml Stopplösung und kurzem Schütteln gestoppt. Anschließend erfolgte die Aufnahme unter Anwendung des Fusion XL Gerätes.

3.2.10 Immunoblotting

Das Immunoblotting dient dem Nachweis immobilisierter Proteine auf einer Trägermembran durch Verwendung spezifischer Antikörper. Das Übertragen der Proteine auf die Membran erfolgt nach Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE. In dieser Arbeit wurde zum Transfer sowohl das Semy-Dry als auch das Wet Verfahren genutzt. Das Wet Verfahren wurde zur Analyse der Proteine nach Behandlung der Mäuse mit PBS oder Poly(I:C) verwendet, alle anderen Immunoblots wurden mit der Semy-Dry Methode generiert. Die Semy-Dry Apparatur war zwischen der Anoden-Platte und der darauf liegenden Kathoden-Platte wie folgt beschrieben aufgebaut. Auf drei Whatman-Papiere, die auf die SDS-Gelgröße zugeschnitten wurden, folgte die Nitrocellulose Transfermembran, anschließend das SDS-Polyacrylamid-Gel und zuletzt wieder drei Whatman-Papiere. Die Whatman-Papiere wurden zuvor mit Transferpuffer getränkt und die Transfermembran im Transferpuffer äquilibriert. Die Kathoden-Platte wurde durch einen 5 kg schweren Eimer mit Wasser beschwert. Der Transfer der Proteine wurde 80 min bei einer konstanten Stromstärke von 40 mA durchgeführt, was $0,6 \text{ mA/cm}^2$ entspricht.

Zur Durchführung des Wet-Blots wurde eine Kassette vertikal in die Blotting-Apparatur eingelegt und während des Transferprozesses mit einem bei -20°C vorgekühltem Eispad gekühlt. In die Kassette wurde zunächst ein Faser-Pad eingelegt, gefolgt von Whatman-Papieren, dem SDS-Polyacrylamid-Gel (Mini-PROTEAN Tris-Glycin Gele), der PVDF-Transfermembran und erneut Whatman-Papieren geschlossen von einem Faser-Pad. Die PVDF-Membran wurde zuvor in Methanol und Transferpuffer äquilibriert, um die Proteinbindestellen zu aktivieren, die Whatman-Papiere in Transferpuffer. Der Transfer erfolgte bei 30 Volt (90 mA) über Nacht.

Nach dem Transfer wurde die Membran 1 h bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht in 5% Milchpulver in TBST inkubiert, um freie Proteinbindestellen auf der Membran zu blockieren. Anschließend wurde die Membran in einem Falcon auf einem Rollenmischer für 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper, welcher in 5% Milchpulver in TBST verdünnt wurde, inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Membran für 7 min in TBST wurde die Membran für 2 h mit dem Merettichperoxidase (engl. horse radish peroxidase = HRP) - konjugiertem Sekundärantikörper inkubiert. Dieser wurde je nach Antikörper 1:10000 – 1:20000 in 5% Milchpulver in TBST verdünnt. Zuletzt wurde die Membran wieder dreimal 7 min in TBST auf dem

Horizontalschüttler gewaschen. Zur Detektion wurde die Membran mit einer Substratlösung inkubiert. Je nachdem wie stark die Signalintensität gewünscht war, wurden die SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate-Lösung (Inkubation 1 min) oder das reaktivere HRP-Juice (Inkubation 3 min) verwendet. Die Detektion war nach Umwandlung des Substrates Luminol durch die HRP durch Darstellung der Chemilumineszenz mithilfe von Autoradiographie-Filmen (Amersham-Hyperfilm ECL) oder des Chemilumineszenz-Detektions-Systems Fusion FX möglich.

Tabelle 32: Antikörperkonzentrationen im Immunoblotting

Antikörper	eingesetzte Konzentration, Inkubationsbedingung
Clr-a 2E3	20 µg/ml, 4°C ü.N. oder übers WE
Clr-a/Clr-f 3C7	Hybridomüberstand 1:2 in Milchpulver, 4°C ü.N.
FLAG M2-bio	1 µg/ml, 4°C ü.N. oder übers WE
SA-HRP	1:20000 (Jackson), 2,5 h bei RT
Ziege anti-Ratten HRP	1:20000, 2,5 h bei RT

3.2.11 Strippen von Membranen

Zur Entfernung von gebundenen Antikörpern von einer Immunoblot-Membran wurde ReBlot Plus Mild Stripping Lösung (Millipore) verwendet. Diese wurde 1:10 mit didestilliertem Wasser verdünnt und die Membran mit 3 ml Ansatz in einem Falcon für 15 min auf einem Rollenmischer inkubiert. Anschließend wurde die Membran zweimal für 5 min mit 5 % Milchpulver in 1x TBST gewaschen und erneut mit einem Antikörper inkubiert.

3.2.12 Epitopkartierung der anti-Clr-a Antikörper 2E3 und 3C7

Zur Epitopkartierung wurden Sequenzen von Clr-a synthetisiert im Aminosäureabschnitt 77-216. Die Peptide waren 18 Aminosäuren lang und jeweils um eine Aminosäure versetzt. Die Synthese erfolgte durch Fmoc Chemie an aktivierten PEG Spacern auf Cellulose Membranen mittels einer automatischen parallelen Peptidsynthese mithilfe eines MultiPep RS Gerätes (Intavis, Köln). Die Bindungsexperimente wurden durchgeführt wie bereits beschrieben (Hilpert, Winkler, & Hancock, 2007; Plewnia, Schulze, Hunte, Tampé, & Koch, 2007). Zunächst wurden die freien Bindungsstellen gesättigt. Anschließend wurden die Peptidmembranen mit dem Primärantikörper inkubiert gefolgt von einem HRP-gekoppelten Ziegen anti-Ratte Antikörper. Die Visualisierung erfolgte mittels Chemilumineszenz.

3.3 Immunologische Methoden

3.3.1 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie dient zur Unterscheidung von Zellen anhand ihrer Größe und Granularität. Zusätzlich können Zellen durch Markierung mit Fluorophor-gekoppelten Antikörpern auf das Vorhandensein bestimmter Proteine untersucht werden.

Hierfür werden die Zellen durch hydrodynamische Fokussierung in einem Flüssigkeitsstrom vereinzelt und in Reihe angeordnet. Im Messbereich werden die Zellen von verschiedenen Lasern sequentiell angestrahlt. Anhand des Lichts, welches an der Zelle gebrochen wird kann mit Hilfe eines Forward- die Zellgröße und des Side-Scatter die Granularität bestimmt werden. Fluorophormarkierte Proteine können durch ihre spezifischen Emissionen gemessen werden.

Es wurden je nach Zelllinie bzw. Primärgewebe zwischen 3000 und 200.000 Zellen pro Vertiefung einer 96-Lochplatte eingesetzt und durch Zentrifugation bei 1600 rpm für 3 min bei 4 °C zweimal mit FACS-Puffer gewaschen. Die Zellen wurden mit Primärantikörper (5-30 µg/ml) für 20-40 min auf Eis inkubiert und wiederum dreimal mit FACS Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 20-40 min mit Sekundärantikörper auf Eis inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschritten wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Zur Vitalitätsüberprüfung der Zellen wurden diese zusätzlich mit DAPI (30-100 ng/ml in Wasser) unmittelbar vor der Messung inkubiert.

3.3.2 Degranulationsanalyse mittels CD107a

LAMP-1 (engl. = lysosomal-associated membrane protein-1), auch als CD107a bezeichnet, dient als sensibler Marker für die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen und zytotoxischen T-Zellen (Alter, Malenfant, & Altfeld, 2004). Das Cytoplasma der NK-Zellen beherbergt eine Reihe an cytolytischen Vesikeln, die eine hohe Anzahl an cytolytischen Proteinen wie Perforin und Granzym B enthalten. Nach Aktivierung der NK-Zellen werden diese Granuli in die immunologische Synapse freigesetzt, um die Zielzellen zu lysieren. LAMP-1 oder auch CD107a ist in der lysosomalen Membran lokalisiert und wird während der Degranulation der cytolytischen Granuli kurzzeitig auf der Zelloberfläche von NK-Zellen exprimiert. Durch Detektion von CD107a mit einem anti-CD107a Antikörper und anschließender Analyse in der Durchflusszytometrie lässt sich somit die Degranulation der NK-Zellen verfolgen.

Für den Degranulationsversuch wurden NK92-M1 Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit Medium auf eine Zellzahl von 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. Es wurden 50 µl mit 5×10^4 Zellen in ein Loch einer 96-Loch-Rundbodenplatte pipettiert. Anschließend wurden die COS7 Zielzellen, die

ebenfalls zweimal mit PBS gewaschen wurden, im Verhältnis 1:1 zu den Effektorzellen pipettiert. Pro Kokulturguppe wurden jeweils Triplikate pipettiert. Direkt zur Kokultur wurde ein APC-konjugierter CD107a Ak gegeben in einer Endkonzantration von 1:50. Als Positivkontrolle wurde PMA (25 ng/ml) und Ionomycin (1 μ M) eingesetzt, um eine maximale CD107a Oberflächenexpression zu erzielen. Die Inkubation erfolgte für 2 h bei 37°C. Anschließend wurden die Zellen für die Durchflusszytometrie mit einem PerCP/Cy5.5-konjugiertem anti-humanem CD56 Ak gefärbt und CD56⁺ NK-Zellen in der Durchflusszytometrie auf CD107a Expression hin analysiert.

3.3.3 Immunfluoreszenz

Bei der Immunfluoreszenz können Antigene mittels Fluorochrom-markierter Antikörper in Zellpräparaten oder Geweben visualisiert und somit im subzellulären Bereich lokalisiert werden. Mittels Fluoreszenzmikroskopie wird das emittierte Licht nach Anregung der fluoreszierenden Moleküle mit Licht einer bestimmten Wellenlänge detektiert. Hierfür wurden Teile des Dünndarmes und des Kolons von Mäusen sowie Organoide in Tissue-Tek durch Einfrieren bei -20°C fixiert. Unter Verwendung eines Kryomikrotoms wurden 8-10 μ m große Gefriergewebeschnitte geschnitten und auf einem Objektträger geschichtet. Die Gefriergewebeschnitte wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert.

Die Gefriergewebeschnitte auf den Objektträgern wurden in einem Färbekasten mit 4°C kaltem Aceton (100 %) auf einem Wackelschüttler für 10 min fixiert und anschließend für 15 min bei Raumtemperatur getrocknet.

Nach Rehydrierung der Schnitte für 2 min in TBS (im Färbekasten bei RT) wurden diese in einer mit feuchten Tüchern ausgelegten Kammer zur Epitop-Demaskierung für 15 min bei 98°C im Trockenschrank unter Zugabe von 300 μ l Citratpuffer (10 mM, pH 6,0) pro Schnitt inkubiert (Kakimoto, Takekoshi, Miyajima, & Osamura, 2008). Anschließend wurden die Schnitte kurz bei Raumtemperatur abgekühlt, mit TBS gewaschen und unter Verwendung des Immunfluoreszenz Detektions-Kits Max-Hetero Rat on Mouse MaxFluor 488 nach Herstellerprotokoll (MaxVision Biosciences, Bothwell, BA) behandelt. Die Epitop-Demaskierung wurde nur bei Färbung der Schnitte mit dem anti-Clr-a Antikörper 2E3 und der entsprechenden Isotypkontrolle (150 μ l pro Schnitt) durchgeführt. Die Färbung erfolgte über Nacht bei 4°C mit einer Ak-Konzentration von 3 μ g/ml in 3 % BSA in TBS.

Ein weiteres Färbeprotokoll ohne Verwendung eines Kits zur Färbung von Clr-a nach Epitop-Demaskierung sowie zur Färbung der Schnitte mit anderen Antikörpern wird im Folgenden beschrieben. Hierfür wurden die Schnitte wie oben beschrieben rehydriert und anschließend freie Bindungsstellen für 10 min bei RT mit 10 % Ziegenerum in einer 3% BSA in TBS-Lösung

(150 µl/Schnitt) blockiert. Der Blockierungsschritt sowie die Inkubation mit den jeweiligen Antikörpern erfolgten in einer Feuchtekammer.

Die Inkubation mit dem anti-Clr-a Ak 2E3 oder der entsprechenden Isotypkontrolle erfolgte über Nacht bei 4°C mit 3 µg/ml Ak in 3% BSA in TBS gefolgt von einem Cy3-gekoppeltem Ziegen anti-Ratte Ak (BioLegend, 150 µl/Schnitt, 1:100 in 3 % BSA/TBS, 2 h bei RT).

Die Inkubation mit dem anti-Clr-f Ak 10A6 oder der entsprechenden Isotypkontrolle erfolgte für 2 h bei RT mit 6 µg/ml Ak in 3% BSA in TBS gefolgt von einem Cy3-gekoppeltem Ziegen anti-Ratte Ak (BioLegend, 150 µl/Schnitt, 1:100 in 3 % BSA/TBS, 2 h bei RT).

Die Inkubation mit dem AlexaFluor 647-gekoppeltem anti EpCAM Ak erfolgte für 2 h bei RT mit 1 µg/ml Ak in 3% BSA in TBS.

Zwischen den Inkubationsschritten wurden die Schnitte dreimal für 2 min mit TBS gewaschen. Zuletzt wurden die Gefriergewebeschnitte ebenfalls dreimal für 2 min in TBS im Färbekasten auf einem Wackelschüttler gewaschen und mit den Deckgläschen unter Verwendung der ProLong Gold antifade mountant-Lösung (Thermo Fisher Scientific) mit DAPI gefärbt und fixiert. Zur Visualisierung der Färbung wurde ein DMI6000B Mikroskop verbunden an eine DFC3000G Kamera oder ein Leica TCS SP8 Konfokalmikroskop verwendet. Die aufgenommenen Bilder wurden nachträglich unter Verwendung der Leica-Software oder des Programmes ImageG bearbeitet.

3.4 Bestimmung der Antikörperisotypen

Der Isotyp der Ratten Clr-a Antikörper wurde unter Verwendung des Rat Immunoglobulin Isotyping ELISA Kits bestimmt. Die Durchführung erfolgte nach Protokoll des Herstellers (BD Pharmingen™, BD Biosciences).

3.4 Zellbiologische Methoden

3.4.1 Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Die Kultivierung aller Zelllinien erfolgte im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂. Stabile RSV-transfizierte CHO Zellen wurden in IMDM kultiviert mit 2 mg/ml G418 zur Selektion. Stabile 293T oder 293 stabil transfiziert mit pSecTag2 wurden in DMEM mit 0,2 mg/ml Hygromycin B gehalten. COS7 Zellen wurden in IMDM und NK-92MI-Nkrp1g in IMDM mit 5 µg/ml Puromycin. BWN.3G-Reporterzellen wurden in RPMI 1640 mit 0,5 mg/ml Hygromycin B und 50 µM β-Mercaptoethanol sowie 1 mg/ml G418 (Nkrp1g) oder 2 µg/ml Puromycin (Nkrp1a, Nkrp1b, Nkrp1c, Nkrp1f) zur Selektion kultiviert.

Alle Medien wurden mit 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin.

Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von 70-80% 2-3 mal pro Woche passagiert: für adhärente Zellen wurde ein Verhältnis von 1:6 bis 1:15 und für Suspensionszellen ein Verhältnis von 1:6 bis 1:24 pro Passage gewählt. Hierfür wurde bei adhärenenten Zellen das Medium aus der Zellkulturflaschen entnommen, die Zellen kurz in PBS geschwenkt und anschließend durch Verwendung von Trypsin/EDTA vom Boden der Kulturflasche gelöst. Die Trypsinierung wurde durch Zugabe von Medium gestoppt und das entsprechende Volumen in der Zellkulturflasche übrig gelassen und durch Resuspension in neuem Medium aufgenommen.

3.4.2 Konservierung von eukaryotischen Zellen

Zur Lagerung von eukaryotischen Zellen in flüssigem Stickstoff bei -196 °C wurden diese zunächst 3 min bei 1600 rpm zentrifugiert und zweimal mit 2-3 ml eiskaltem PBS gewaschen. Pro Kryoröhrchen wurden $4-6 \times 10^6$ Zellen in 1 ml Einfriermedium (90 % FCS und 10 % DMSO) eingefroren. Dieses wurde im Einfrierbehälter zunächst bei -80 °C gelagert und anschließend frühestens nach 24 Stunden in den Stickstofftank überführt. Zur Rekultivierung wurden die Zellen bei 37°C im Wasserbad aufgetaut, mit 37°C warmem Medium gewaschen und in Kultur genommen.

3.4.3 Bestimmung der Lebendzellzahl

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurden die Zellen gegebenenfalls in PBS verdünnt, in einem Verhältnis von 1:1 mit Trypanblau (Benzaminblau) versetzt und 10 µl in eine Neubauer-Zählkammer überführt. Die Zählung erfolgte am Lichtmikroskop und die Zellzahl wurde anhand folgender Formel ermittelt:

$$\text{Zellen/ml} = ((\text{Gesamtzellzahl 4 Großquadrate})/4) \times 2 \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

Alternativ wurde die Zellzahl mittels Cedex-Cell Counter automatisiert bestimmt.

3.4.4 Transfektion von eukaryotischen Zellen

3.4.4.1 Transfektion mittels Applifect

Für die Transfektion unter Verwendung von AppliFect wurden die Zellen in eine 6-Loch-Platte ausgesät und über Nacht bis zum Erreichen von einer Konfluenz von etwa 70-80 % bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Für transiente Transfektionen wurden 5×10^5 Zellen in 2 ml Kulturmedium pro Loch ausgesät. Zur Ausbildung der DNA-Lipid-Komplexe wurden pro Ansatz zwei Reaktionsgefäße mit jeweils 100 µl RPMI 1640 Medium ohne Zusätze vorbereitet. In das eine Gefäß wurden 6 µl AppliFect hinzugegeben,

in das zweite 2 µg Plasmid-DNA in einer Konzentration von 0,5 µg/µl. Der Plasmid-Ansatz wurde langsam zum AppliFect-Ansatz hinzugegeben, 20 min bei RT inkubiert und anschließend tröpfchenweise zu den Zellen pipettiert. 24 h bis 48 h nach Transfektion wurden die Zellen vom Boden der 6-Loch-Platte abgelöst und die Proteinexpression mittels Durchflusszytometrie analysiert.

3.4.4.2 Transfektion mittels FugeneHD

Zur Transfektion unter Verwendung von FugeneHD wurden für eine transiente Transfektion 5×10^5 Zellen und für eine stabile Transfektion 3×10^5 Zellen in 2 ml Kulturmedium pro Loch einer 6-Loch-Platte ausgesät und über Nacht bis zu einer Konfluenz von 70-80 % kultiviert. Zur Ausbildung der DNA-Lipid-Komplexe wurden pro Ansatz 2 µg Plasmid-DNA mit einer Konzentration von 0,5 µg/µl in 100 µl RPMI 1640 ohne Zusätze hinzugegeben und dieser anschließend mit 6 µl FugeneHD Transfektionsreagenz versehen. Nach kurzem vorsichtigem Invertieren wurden die Ansätze für 15 min bei RT inkubiert und anschließend tröpfchenweise auf dem Zellrasen verteilt. Im Falle eines analytischen transienten Ansatzes wurde die Proteinexpression nach Ablösen der Zellen nach 24 h durchflusszytometrisch untersucht. Bei einer stabilen Transfektion wurde den Zellen 48 h nach Transfektion Antibiotikum zur Selektion hinzupipettiert. Das Wachstum der Zellen wurde im Lichtmikroskop verfolgt und das Medium entsprechend 2-3 mal wöchentlich gewechselt. Bei Beobachtung eines anfänglichen verstärkten Wachstums der Zellen wurden diese subkloniert, um einen stabilen Zellklon mit einheitlicher Proteinexpression zu erhalten. Hierfür wurden auf zwei Reihen einer 96-Loch-Platte in jeweils 200 µl pro Loch 10 Zellen pro Loch, in 6 Reihen der 96-Loch-Platte 1 Zelle pro Loch und auf eine ganze 96-Loch-Platte 0,1 Zelle pro Loch ausgesät. Nach drei bis sechs Wochen wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie auf Proteinexpression hin untersucht.

3.4.4.3 Transfektion mittels Polyethylenimine (PEI)

Zur Transfektion mittels PEI (Polyethylenimine) wurden 24 h vor der Transfektion 2×10^7 293T pro T175-Zellkulturflasche ausgesät. Am nächsten Tag wurde dieses Medium direkt vor der Transfektion gegen DMEM (high Glucose, ohne FCS) ausgetauscht. Die Transfektion erfolgte unter Anwendung von zwei Ansätzen. Der erste Ansatz enthielt den Vektor in 5 % Glucose und der zweite Ansatz die entsprechende Menge an TA-Trans (PEI) in 5% Glucose. Pro T175-Flasche wurden für den ersten Ansatz 65 µg Vektor mit 310 µl 5% Glucose gemischt. Ansatz zwei enthielt 65 µl TA-Trans (PEI) in 310 µl 5% Glukose. Beide Lösungen wurden jeweils auf dem Vortexer gemischt und für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Lösungen zusammengeführt, wieder auf dem Vortexer gemischt, und für 10 min bei RT inkubiert. Das Transfektionsreagenz wurde mit DMEM-Medium (ohne FCS) gemischt und

tropfenweise zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden für 4-6 h bei 37°C inkubiert und das Medium zuletzt gegen DMEM (mit FCS) ausgetauscht.

3.4.5 Produktion der Fc-Fusionsproteine

Humane IgG1-Fc-Fusionsproteine wurden in 293T produziert. Hierzu wurden die Zellen unter Verwendung von PEI (siehe Abschnitt 3.4.4.3) transient mit einem pFUSE-hlgG1-FcEQ transfiziert. Zur Produktion eines Konstruktes wurden 25-30 T175-Zellkulturflaschen an 293T genutzt. Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Zellkulturüberstände, welche die löslichen Rezeptor-hlgG1-Fc-Fusionsproteine enthielten, gesammelt. Die Überstände wurden mittels eines 0,2 µm-Filters steril filtriert und für die Reinigung über eine Protein-A Säule (Abschnitt 3.2.1.2) mit Protein-A Sepharose versehen.

3.4.6 Elektroporation

Die Elektroporation wurde zur Generierung stabiler BWN.3G Reporterzellen genutzt. Hierfür wurden pro Ansatz 1×10^7 Zellen zweimal mit PBS gewaschen (1600 rpm, 3 min bei 20°C) und in 500 µl RPMI 1640 ohne Zusätze aufgenommen. Zudem wurden in einer Elektroporationskuvette 300 µl RPMI 1640 ohne Zusätze mit 20 µg linearisierter Plasmid-DNA vorbereitet. Die 500 µl an Zellsuspension wurden zur Plasmid-DNA hinzu pipettiert und leicht gegen die Kuvette geschnippt, um beide Ansätze zu vermischen. Danach wurden die Zellen 15 min auf Eis inkubiert. Nach erneutem leichtem Schnippen wurden die Zellen bei 960 uF und 250 V elektroporiert und wiederum 15 min auf Eis gekühlt. Der Ansatz wurde aus der Kuvette entnommen, mit 48 ml Kulturmedium aufgefüllt, resuspendiert und jeweils 1 ml pro Loch auf zwei 24-Loch-Platten verteilt. Dies entspricht einer Zellzahl von $2,1 \times 10^5$ Zellen pro Loch. Nach 48 h wurden die Zellen nach Zugabe von Antibiotika-haltigem Medium unter Selektionsdruck gesetzt.

3.4.7 Transduktion von BWN Reporterzellen

BWN.3G Nkrp1a, Nkrp1c und Nkrp1d Reporter wurden mittels retroviraler Transduktion generiert. Die Produktion der Viren erfolgte durch Transfektion von 293T Phoenix-Eco mit cDNA enthaltenden pMXsIP Vektoren. Pro Ansatz wurden 5×10^6 293T Phoenix Eco in einer 10 cm Schale in 10 ml DMEM (high Glucose, mit Zusätzen) ausgesät. Am nächsten Tag wurden diese mit dem jeweiligen pMXsIP Vektor unter Nutzen von AppliFect transfiziert. Hierbei wurde ein Plasmid zu AppliFect Verhältnis von 1:3 (14 µg Plasmid und 42 µl AppliFect) gewählt. An Tag 3 wurde den 293T Phoenix Eco das Medium

abgenommen und durch 5 ml RPMI 1640-Medium (mit Zusätzen) ersetzt. Am tag der Transduktion wurde die Zentrifuge 1 h auf 32°C vorgewärmt. Die Virus enthaltendne Überstände der 293T Phoenix Eco wurden eingesammelt und durch einen 0,2 µm Filter steril filtriert. Anschließend wurde Polybrene in einer Endkonzentration von 8 µg/ml (Verdünnung 1:1000) hinzugegeben. Pro Ansatz werden zwei Löcher einer 24-Lochplatte mit je 1×10^5 BWN.3G in je 100 µl pipettiert. Nach Zugabe von je 500 µl Virusüberstand wurden die Zellen für 1,5 h bei 900xg und 32°C zentrifugiert und anschließend für 2 h bei 37°C inkubiert. Es erfolgt eine Zugabe von 0,5 ml RPMI (mit Zusätzen) und die Kultivierung über Nacht bei 37°C. Der restliche Virusüberstand wird bei 4°C gelagert. Am zweiten tag der Transduktion (Tag 5) werden die Zellen pro Ansatz in ein 15 ml falcon gepoolt und 3 min bei 1600 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 2 ml Virusüberstand resuspendiert und je 500 µl auf Löcher einer 24-Lochplatte verteilt. Nach der Zentrifugation für 1,5 h bei 32°C und 900xg werden die Ansätze für 2 h bei 37°C inkubiert, erneut 500 µl pro Loch RPMI-Medium (mit Zusätzen) hinzugegeben und anschließend für 3 Tage bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Überprüfung der Transduktion erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Nach erfolgreicher Expression wurden die BWN.3G Reporterzellen mit 5 µg/ml Puromycin unter Selektion gesetzt.

3.4.8 BWN-Reporterversuch

BWN.3G Reporterzellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und mit der Vybrant DiD-Lösung unter Anwendung des Herstellerprotokolls (Thermo Fisher Scientific) markiert. Die Zellen wurden anschließend mit RPMI-Medium (mit Zusätzen) auf eine Zellzahl von 5×10^5 Zellen/ml eingestellt und je 100 µl (5×10^4 Zellen) Zellsuspension in Triplikaten je Kokulturgruppe in ein Loch einer 96-Loch-Zellkulturplatte pipettiert. Zu den Reporterzellen wurden 5×10^4 Zielzellen bei Zelllinien und 2×10^5 Zielzellen im Falle von frisch isolierten Primärzellen gegeben. Diese wurden zuvor ebenfalls zweimal mit PBS gewaschen und mit RPMI-Medium (mit Zusätzen) auf die entsprechende Zellzahl eingestellt, sodass 100 µl pro Loch zu den Effektorzellen hinzugegeben wurde. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C, nachdem die Platte kurz anzentrifugiert wurde, um die Zellpopulationen am Boden der Kulturplatte zu vereinen. Als positiv-Kontrolle wurden die BWN.3G Reporterzellen mit PMA (20 ng/ml) und Ionomycin (0,5 µM) stimuliert, um die maximale Reaktionsfähigkeit der Zellen zu analysieren. Zusätzlich wurde die durch die FLAG-Markierung der Fusionsproteine vermittelte Reaktivität untersucht durch Stimulation der Reporterzellen mit einem anti-FLAG M2 Ak und der entsprechenden Isotypkontrolle. Es wurde eine Nunc MaxiSorp 96-Loch-Platte (Thermo Fisher Scientific) durch Inkubation der Platte über Nacht bei 4°C mit 100 µl Ak-Lösung in einer Konzantration von 10 µg/ml beschichtet. Die Platte wurde zweimal mit PBS gewaschen, bevor unmarkierte Reporterzellen in

Triplikaten in die Platte pipettiert wurden. Nach Inkubation wurden die Zellen wiederum zweimal in FACS-Puffer gewaschen und durchflusszytometrisch auf Induktion der eGFP Expression untersucht.

In Kokulturerperimenten mit 293T, die sowohl Clr-a als auch Clr-f koexprimierten, wurden die Zellen mit einem APC-konjugiertem Maus anti-humanem HLA-A,B,C Ak gefärbt und HLA-A,B,C-negative Reporterzellen auf GFP Expression analysiert.

3.4.9 Isolation von Maus Milzzellen

Die Isolation der Milzzellen erfolgte nach Tötung der Maus durch zervikale Dislokation. Nach Entnahme der Milz wurde diese in PBS geschwenkt und durch ein 40 µm-Sieb mit dem Stempel einer 5 ml-Spritze in ein 50 ml Falcon püriert. Die Splenozyten wurden für 5 min bei Raumtemperatur durch Zugabe von 3 ml BD Pharmlyse-Lösung (1:10 verdünnt in Wasser) behandelt, um die Erythrozyten zu lysieren. Anschließend wurde die Zellsuspension mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und für 10 min bei 400 xg zentrifugiert. Insgesamt wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und das Pellet zuletzt in entsprechendem Volumen an PBS resuspendiert.

3.4.10 Isolation der Ratten Milz und Blutentnahme

Die Ratte wurde unter einem Abzug mit Isofluran narkotisiert und anschließend durch Dekapitation getötet. Durch vorsichtiges Massieren des Rattenkörpers konnten insgesamt 3-5 ml Blut aus der Ratte in ein 15 ml Falcon gewonnen werden. Nach Aufschneiden der Bauchdecke wurde die Milz unter unsterilen Bedingungen frei präpariert und in eine Zellkulturschale gelegt. Anschließend wurde für die Fusion eine Einzellzellsuspension hergestellt. Dieser Vorgang ist im nächsten Abschnitt 3.4.11 beschrieben.

Das gewonnene Blut aus der Ratte wurde zum Gerinnen bei RT stehen gelassen, durch leichtes Anstupfen im Falcon gelockert und bei 200xg für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde das Rattenserum abgenommen und bei 4°C für 4 Tage gelagert. Das Serum wurde wiederum zentrifugiert und der reine Überstand nach Zugabe von 0,02 % NaN₃ aliquotiert und bei -20°C zur Lagerung weggefroren.

3.4.11 Fusion von Ratten Milzzellen mit P3x63Ag8.653 (P3X) -Zellen

Am Tag vor der Fusion werden 10-12x 96-Loch Platten (flat-bottom) mit je 100 µl Hy5-Medium pro Loch befüllt und ü.N. bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Am Tag der Fusion wird die Milz aus der Ratte

isoliert (siehe Abschnitt 4.10) und in eine Zellkulturschale gelegt. Die folgenden Arbeiten erfolgen unter der Sterilwerkbank. In die Zellkulturschale wird ein 40 µm-Zellsieb gesetzt und mit 10 ml PBS befüllt. Zur Herstellung der Einzelzellsuspension wird die Milz in das Sieb gelegt und mit dem Stempel einer 2 ml-Spritze mit leichtem Druck durch das Sieb gedrückt. Anschließend wird die Zellsuspension in ein 50 ml Falcon überführt und weitere 10 ml PBS hinzupipettiert, mit denen zuvor die Zellkulturschale gespült wurde. Das Falcon wird auf mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und die Zellen 3x bei 1600 rpm für 6 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wird mit einer Glaskanüle abgesaugt, das Pellet in 50 ml PBS resuspendiert und bei 1600 rpm für 10 min bei RT zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 50 ml PBS resuspendiert und 20 µl zur Bestimmung der Gesamtzellzahl mittels Neubauer Zählkammer entnommen. Nach Zentrifugation bei 1600 rpm für 6 min bei RT werden die Zellen in 20 ml RPMI-Medium (+ Glutamin, + Pen. /Strep.) aufgenommen. Die P3x63Ag8.653-Zellen werden vor Verarbeitung der Milz vorbereitet. Hierzu werden die Zellen 3x in 50 ml RPMI-Medium (+ Glutamin, + Pen. /Strep.) gewaschen und die Gesamtzellzahl mittels Neubauer Zählkammer bestimmt. Anschließend werden die Milzzellen und die P3x63Ag8.653-Zellen im Verhältnis 1:2 anhand folgender Prozedur gemischt. Die benötigte Anzahl an P3x63Ag8.653-Zellen wird in 20 ml RPMI (ohne Zusätze) aufgenommen. In je zwei sterile Glasröhrchen mit einem Rundboden wird je 10 ml P3X-Zellsuspension und 10 ml Milzzellsuspension pipettiert. Anschließend werden die Glasröhrchen mit Parafilm verschlossen. Das eine Röhrchen wird für die Fusion vorbereitet und das zweite bis zur Fusion zunächst im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die Zellsuspension im ersten Glasröhrchen wird bei 1600 rpm für 6 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wird vollständig abgesaugt und das Pellet durch vorsichtiges Klopfen auf den Handrücken in der Restflüssigkeit gelöst. Mit einer 2ml Pipette wird zum gelösten Pellet innerhalb von 60 Sekunden 37°C vorgewärmtes PEG hinzugegeben und das Röhrchen 1 min gedreht. Hierbei wird das Röhrchen ständig gedreht, damit keine Zellklumpen entstehen. Anschließend wird unter ständigem Drehen RPMI (ohne FCS, mit Glutamin und Pen./ Strep.) nach folgendem Schemata zur Zellsuspension hinzugegeben: mit einer 2ml Pipette 2 ml RPMI innerhalb von 1 min, mit einer 5 ml pipette 4 ml RPMI innerhalb von 1 min und zuletzt mit einer 10 ml Pipette 8 ml RPMI. Das Drehen verhindert die Phasenbildung und dient der optimalen Mischung der Zellsuspension. Das Röhrchen wird mit einem Parafilm verschlossen und bei 1400 rpm für 10 min bei RT inkubiert. Der Überstand wird wiederum abgesaugt und das Pellet durch vorsichtiges Klopfen auf dem Handrücken in der Restflüssigkeit gelöst. Das gelöste Pellet wird in 5 ml Hybridoma-Medium (Hy5) resuspendiert und diese in weitere 35 ml Hy5-Medium, welches im 50 ml Falcon vorgelegt wurden, pipettiert. Anschließend werden mit einer 5 ml Pipette jeweils zwei Tropfen pro Loch einer 96-Loch Platte pipettiert. Hierzu werden die am Vorabend mit je 100 µl pro Loch vorbereiteten Platten aus dem Brutschrank genutzt. Etwa 10-12x 96-Loch Platten werden als Päckchen in Zellophan zwei Wochen dauern.

Bei der Herstellung des monoklonalen anti-Clr-a Antikörpers 2E3 konnten bis zu $8,8 \times 10^8$ Milzzellen gewonnen werden. Es wurden $2,2 \times 10^8$ Zellen für die Fusion eingesetzt. Die restlichen Milzzellen wurden auf 6 Gefäße mit je $1,1 \times 10^8$ Zellen aufgeteilt und im Stickstofftank weggefroren. Bei der Herstellung des monoklonalen anti-Clr-a/Clr-f Antikörpers 3C7 konnten bis zu $3,2 \times 10^8$ Milzzellen gewonnen werden. Es wurden $2,1 \times 10^8$ Zellen für die Fusion eingesetzt. $1,1 \times 10^8$ Milzzellen wurden im Stickstofftank weggefroren. Diese wurden mit $1,3 \times 10^8$ P3X fusioniert.

3.4.12 Subklonierung der anti-Clr-a produzierenden Hybridome

Nach dem Screening wurden die anti-Clr-a produzierenden Hybridome subkloniert, um einen einzelnen Klon zu gewinnen, welcher einen monoklonalen Antikörper produziert. Hierzu wurden die Hybridome aus dem entsprechenden Loch der 96-Lochplatte vorsichtig resuspendiert, in Hy 5 Medium verdünnt und nach Zellzählung mittels Neubauer Zählkammer auf eine Zellsuspension mit 100 Zellen pro ml verdünnt. Hieraus wurden zwei weitere Verdünnungen hergestellt: 10 Zellen pro ml und 3 Zellen pro ml. Es wurden jeweils 100 µl Hy5 Medium pro Loch einer 96-Lochplatten vorbereitet und die Verdünnungen wie folgt hinzupipettiert: 2 Reihen der 100 Zellen pro ml Zellsuspension, die restlichen Reihen sowie eine ganze Platte mit der 10 Zellen pro ml Zellsuspension und eine Platte mit 3 Zellen pro ml. Letztere entspricht 0,3 Zellen pro Loch. Fünf Wochen nach der Subklonierungen wurden die Hybridome, die bei 37°C gewachsen sind, erneut gescreent. Insgesamt erfolgten zwei Subklonierungsrunden. Bei der zweiten Runde wurden 100 Zellen pro ml-, 10 Zellen pro ml- und 1 Zelle pro ml-Zellsuspensionen zum Ausplattieren hergestellt.

3.4.13 Kultivierung von Hybridomen nach der Fusion

Direkt nach der Fusion wurden die Hybridome in Hy5 Medium kultiviert. Es erfolgte eine Umgewöhnung der Kulturbedingungen vom Hy5-Medium zu Hy4, Hy3, Hy2 und zuletzt Hy1-Medium, welches zur Langzeitkultivierung der Hybridome genutzt wurde. Die Umgewöhnung erfolgte je nach Vitalität und Aussehen der Hybridome alle 1-3 Passagen durch Zugabe von neuem Medium in 25%-Schritten.

3.4.14 Isolierung von IELs, LPLs und IECs

Die Isolation von intestinalen epithelialen Zellen (Abk. engl. = IECs), intraepithelialen Lymphozyten (Abk. engl. = IELs) und Lamina Propria Lymphozyten (Abk. engl. = LPLs) erfolgte mit leichten Modifikationen nach (Weigmann et al., 2007). Die Bauchdecke der Maus wurde mit autoklaviertem Besteck geöffnet

und der Dünndarm (Schnitt 1 cm unterhalb des Magens sowie kurz vor dem Caecum) und/oder Kolon vorsichtig entnommen. Während der Entnahme wurde das umliegende Fettgewebe entfernt. Die Gewebe wurden durch Schwenken in eiskaltem PBS gewaschen. Die gesamte Durchführung erfolgte, wenn nicht anders beschrieben, auf Eis und das verwendete PBS enthielt 3% FCS und Penicillin/Streptomycin (1x).

Der Dünndarm wurde in zwei Teile geteilt und durch Spülen mit 30-50 ml PBS von Fäkalien befreit. Nach Aufziehen des Darmes auf einen dunklen Draht und Herausschneiden der Peyer'schen Plaques wurde der Darm längs aufgeschnitten und durch kurzes Schütteln im Falcon in 50 ml PBS dreimal gewaschen. Anschließend wurde der Darm in 1 cm große Stücke geschnitten und diese im Falcon in vorgewärmter HBSS-Lösung (5 mM EDTA, 1 mM DTT) für 20 min bei 37°C im Brutschrank auf einem Rotationsmischer bei 21 rpm inkubiert, um die IECs und IELs von der Mucosa zu entfernen. Anschließend wurde die Zellsuspension durch ein 100 µm-Zellsieb gefiltert, auf 50 ml aufgefüllt und auf Eis für 15 min stehen gelassen zur Sedimentation des Kryptepithels. Die obere klarere Zellsuspension wurde entnommen, diesmal durch ein 40 µm-Zellsieb gefiltert und die Epithelzellen/IELs durch Zentrifugation für 10 min bei 4°C und 400xg pelletiert. Anschließend wurden die Zellen entweder zweimal in PBS gewaschen, um direkt im Experiment eingesetzt zu werden, oder zur Isolation der IELs mittels Dichtegradientenzentrifugation (siehe unten) weiter auf Eis gelagert. Das Schütteln in der HBSS-Lösung erfolgte insgesamt dreimal.

Zur Isolation der LPLs wurde das restliche Gewebe in 1 mm große Stücke geschnitten und diese im Falcon durch Schütteln dreimal in 30 ml PBS gewaschen, um das zuvor in der HBSS-Lösung enthaltene EDTA zu entfernen. Anschließend wurde das Gewebe zwei- bis dreimal bis zur vollständigen Zellvereinzelung jeweils 20 min in 5 ml Lösung (PBS mit 0,5 mg/ml Kollagenase D, 0,5 mg/ml DNase I, 2-3 mg/ml Dispase II) im 50 ml Falcon bei 37°C im Brutschrank auf einem Rotationsschüttler inkubiert. Danach wurde die Zellsuspension für 20 Sek. gevortext, über ein 40 µm-Zellsieb filtriert und zweimal durch Zentrifugation für 10 min bei 500xg und 20°C gewaschen.

Zur Isolation der IELs und LPLs wurde nach der Vereinzelung der Zellen eine Percoll-Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt.

Hierfür wurden 15 ml Falcons mit 4 ml 67%iger- (IELs) oder 80%iger (LPLs)-Percoll-Lösung versehen und diese Schicht vorsichtig mit 10 ml 44%iger-(IELs) oder 40%iger (LPLs)-Zellsuspension Lösung beschichtet. Pro Dünndarm wurden drei Falcons verwendet, pro Kolon jeweils 1 Falcon. Zur Herstellung der Lösungen wurde zunächst durch Zugabe von 10x PBS eine 90%ige isotonische Percoll-Lösung gemischt, aus der die weiteren Lösungen verdünnt wurden durch Zugabe von Hy1-Medium. Die Zentrifugation erfolgte bei den IELs für 30 min bei 400xg und 20°C (Beschleunigung und Abstoppen bei Stufe 3) und bei den LPLs für 20 min bei 1000xg und 20°C (Beschleunigung und Abstoppen bei Stufe

3). Nach Absaugen der oberen Schicht wurde die gewünschte Zellpopulation mit einer Pasteurpipette aus der Interphase abgenommen. Die isolierten Lymphozyten wurden mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und durch Zentrifugation (10 min, 400xg, 4°C) gewaschen, bevor sie im Experiment eingesetzt wurden.

3.4.15 Isolierung von intestinalen B und T Zellen

Zur Isolierung von intestinalen B und T Zellen wurden die Lamina Propria Lymphozyten (LPLs) nach der Beschreibung in Abschnitt 4.14 isoliert. Anschließend wurden die LPLs unter Verwendung der Miltenyi Isolationskits markiert und über MACS-Säulen (Miltenyi Biotech) filtriert. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Zur Isolierung der T Zellen wurde das Maus Pan T Zell-Isolationskit II (Miltenyi Biotech) verwendet. Dieses enthält ein Gemisch aus Biotin-konjugierten Aks gegen CD11b, CD11c, CD19, CD45R (B220), CD49b (DX5), CD105, anti-MHC-Klasse II, and Ter-119. Die Isolation der T Zellen beruht auf der Depletion der mit den oben erwähnten Antikörpern markierten Zellen. Die Isolierung der B Zellen wurden unter Verwendung der Maus CD19 MicroBeads durchgeführt.

3.4.16 Isolierung von NK-Zellen

Die NK Zellen wurden aus der Milz der Maus gewonnen. Hierfür wurde die Milz durch ein 100 µm-Zellsieb passiert und mit PBS (3 % FCS und 2 mM EDTA) gewaschen. Die Lyse der Erythrozyten erfolgte durch Zugabe von Pharm Lysepuffer für 3 min bei RT. Anschließend wurden die Splenozyten gewaschen und durch ein 40 µm-Zellsieb filtriert. Die Isolierung der NK Zellen wurde unter Verwendung des Maus NK Zell Isolationskits II (Miltenyi Biotech) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Isolation basiert auf der Depletion der Nicht-Zielzellen.

3.4.17 Isolierung von intestinalen Stammzellen und Stimulation von Organoidkulturen

Die Isolierung der intestinalen Stammzellen aus dem Dünndarm von C57BL/6 Mäusen und die Erzeugung von Organoidkulturen erfolgte im Labor von Dr. Henner Farin am Georg-Speyer-Haus in Frankfurt (Farin, Van Es, & Clevers, 2012; Sato et al., 2009a). Die Organoidkulturen wurden nach Stimulation zur Isolierung der RNA beziehungsweise nach Fixierung zur Färbung für die Immunfluoreszenz zur Verfügung gestellt. Die Stimulation erfolgte in Triplikaten für 2 h mit je 20 ng/ml TNFα, IL-22, IFNβ oder 5 ng/ml IFNγ beziehungsweise H₂O als Kontrolle. Die Isolierung der RNA erfolgte unter Verwendung des NucleoSpin RNA (Macherey-Nagel) Kits am Georg-Speyer-Haus.

Zur Färbung mittels Immunfluoreszenz wurden die Organoidkulturen über Nacht in 2 % PFA fixiert, anschließend mit PBST (0,1 % Tween 20) permeabilisiert und zuletzt freie Bindungsstellen mit 2 % Eselserum in PBS blockiert. Nach Zugabe von Natriumazid zu den Organoiden in PBS wurden diese bis zur Färbung bei 4°C gelagert.

3.5 Tierexperimentelle Methoden

Die durchgeführten Tierexperimente wurden dem Regierungspräsidium (Darmstadt, Deutschland) angezeigt beziehungsweise von diesem genehmigt und liefen unter den Anzeige-/Genehmigungsnummern F146/04, F146/Anz03 und FU/1134. Die Durchführung erfolgte unter Einhaltung der nationalen Richtlinien. Die Tiere wurden an der Zentralen Forschungseinrichtung der Universität Frankfurt gehalten.

3.5.1 Tierstämme

In dieser Arbeit wurde experimentell mit folgenden Tieren gearbeitet:

C57BL/6 Mäuse wurden von Envigo bezogen (Horst, Niederlande).

BALB/c Mäuse wurden von Envigo bezogen (Horst, Niederlande).

TLR3^{-/-} Mäuse wurden freundlicherweise von Herr Prof. Bauer (Marburg) zur Verfügung gestellt (Honda et al., 2003).

Clr-^f^{-/-} Mäuse wurden im Auftrag von Prof. Steinle und unter Anleitung von Frau Dr. Miriam Friede von Cyagen generiert und für die Experimente zur Verfügung gestellt. Der Knockout basiert auf einer zielgerichteten Deletion des Exon 3 von *Clec2h*. Diese Mutation resultiert in einem Frameshift und der Expression eines kleineren Transkripts.

PVG Ratten wurden von Envigo bezogen (Horst, Niederlande) und zur Herstellung von monoklonalen anti-Clr-a Antikörpern genutzt.

CD Ratten stammen aus den Charles River Laboratorien (Sulzfeld, Deutschland) und wurden ebenfalls zur Herstellung von monoklonalen anti-Clr-a Antikörpern genutzt.

3.5.2 Immunisierung von Ratten

Bei der Immunisierung der Ratten zur Herstellung der monoklonalen anti-Clr-a Antikörpern wurden zwei unterschiedliche Immunisierungsprotokolle angewendet. Die Grundlage für das erste Protokoll (Herstellung anti-Clr-a 2E3) basierte auf den Erfahrungen der Arbeitsgruppe Prof. Steinle. Das zweite

Protokoll (Herstellung anti-Clr-a/Clr-f) wurde modifiziert basierend auf den Angaben zur Herstellung eines Ratten monoklonalen Antikörpers von Thermo Fisher Scientific „Custom Rat Monoclonal Antibody Development Protocols“. Die beiden Immunisierungsprotokolle sind in den folgenden Tabellen 32 und 33 dargestellt.

Tabelle 33: Immunisierungsschema zur Produktion des monoklonalen anti-Clr-a Antikörpers 2E3

Immunisierungs-Nr.	Tag	Ansatz	Applikation
Immunisierung 1	1	225 µl Freund's Adjuvans Complete + 22,5 µg (173 µl) lösl. Clr-a Batch II + 52 µl PBS (1x, steril)	Injektion s.c., 3 Stellen
Immunisierung 2	12	150 µl Freund's Adjuvans Incomplete + 10,2 µg (78 µl) lösl. Clr-a Batch II + 72 µl PBS (1x, steril)	Injektion s.c. 3 Stellen
Immunisierung 3	24	150 µl Freund's Adjuvans Incomplete + 10,2 µg (82 µl) lösl. Clr-a Batch IV + 68 µl PBS (1x, steril)	Injektion s.c. 3 Stellen
Immunisierung 4	94	1x10 ⁷ Rat 2 WT + 17 µg (136 µl) lösl. Clr-a Batch IV + 364 µl PBS (1x, steril)	Injektion i.p.
Boost 1	100	1x10 ⁷ Rat 2 WT + 17 µg (136 µl) lösl. Clr-a Batch IV + 364 µl PBS (1x, steril)	Injektion i.p.
Fusion	103	-----	-----

Tabelle 34: Immunisierungsschema zur Produktion des monoklonalen anti-Clr-a/Clr-f Antikörpers 3C7

Immunisierungs-Nr.	Tag	Ansatz	Applikation
Immunisierung 1	1	100 µl Freund's Adjuvans Incomplete + 10,5 µg (30 µl) lösl. Clr-a Batch VI + 70 µl PBS (1x, steril)	Injektion s.c.
Immunisierung 2	16	25 µl Freund's Adjuvans Incomplete + 2,6 µg (7,5 µl) lösl. Clr-a Batch VI + 17,5 µl PBS (1x, steril)	Injektion s.c.
Immunisierung 3	29	100 µl Freund's Adjuvans Incomplete + 10,5 µg (30 µl) lösl. Clr-a Batch VI	Injektion s.c.

Immunisierungs-Nr.	Tag	Ansatz	Applikation
		+ 70 µl PBS (1x, steril)	
Boost 1	38	35 µg (100 µl) lösl. Clr-a Batch VI + 140 µl PBS (1x, steril)	Injektion i.p.
Boost 2	42	35 µg (100 µl) lösl. Clr-a Batch VI + 150 µl PBS (1x, steril)	Injektion i.v. (Schwanzvene)
Fusion	45	-----	-----

Als Adjuvans wurde das Freund's Adjuvans verwendet. Es wurde im Jahre 1940 von Jules Freund entwickelt und dient der Auslösung einer starken Immunantwort (Freund, 1947; FREUND, 1956; Freund & McDermott, 1942). Die Proteinlösung wurde mit dem Freund's Adjuvans in einem Verhältnis von 1:1 gemischt (Tabelle 32 und 33) und bis zur Bildung einer homogenen weißen Emulsion für 15 min gevortext. Die Complete-Emulsion enthält neben Mannid Monooleat abgetötetes *Mycobacterium tuberculosis*. Für das Verabreichen der Emulsion aus löslichem Clr-a und Adjuvans wurden die Ratten mit Isofluran narkotisiert. Bei einer 4%igen O₂-Zufuhr wurde die Narkose mit 4% Isofluran eingeleitet und mit 2% gehalten. Zur Überprüfung der Antikörperbildung im Serum wurde den Ratten jeweils direkt vor der Immunisierung retrobulbär Blut abgenommen.

3.5.3 Behandlung von Mäusen mit Poly(I:C)

Die intraperitoneale Applikation von Poly(I:C) erfolgte unter Verwendung von HMW (engl. = high molecular mass) Poly(I:C) von InvivoGen. Die Zubereitung der Poly(I:C)-Lösung erfolgte nach Herstellerangaben. Es wurden 30 µg pro Gramm Körpergewicht injiziert (McAllister et al., 2013). Die Kontrollmäuse wurden mit dem entsprechenden Volumen an PBS behandelt. 16 h nach Applikation wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet und die Gewebe zur Analyse mittels quantitativer Echtzeit-PCR (3.1.5), Immunoblot (3.2.10), Immunfluoreszenz (3.3.3) oder Durchflusszytometrie (3.3.1) entnommen.

4 Ergebnisse

4.1 Gewebespezifische Expression von *Clec2e* im Gastrointestinaltrakt

Um einen Einblick in die Gewebeexpression von *Clec2e* in der Maus zu erhalten, wurde zunächst cDNA aus 17 verschiedenen Geweben von C57BL/6 Mäusen auf die Präsenz von *Clec2e* Transkripten mittels quantitativer Echtzeit-PCR untersucht. Hierbei stellte sich heraus, dass *Clec2e* Transkripte ausschließlich in bestimmten Bereichen des Gastrointestinaltraktes detektiert werden konnten (Abbildung 11 A). Diese gewebespezifische Expression von *Clec2e* war insbesondere auf den Dünndarm und den Kolon beschränkt. Alle anderen getesteten Organe hingegen wiesen nur marginale oder nicht detektierbare Transkriptmengen auf (Abbildung 11 A). So waren im Magen etwa 200-fach weniger *Clec2e* Transkripte vorhanden als im Dünndarm. Bei der Analyse der verschiedenen Abschnitte des Gastrointestinaltraktes war auffällig, dass alle Abschnitte des Dünndarms und des Kolons substantielle Mengen an *Clec2e* Transkripten enthalten, diese jedoch entlang der intestinalen Achse eindeutig variieren (Abbildung 11 B). Während im Jejunum die höchste Transkriptmenge zu beobachten war, enthielten das Ileum etwa 6-fach und der absteigende Teil des Kolons (Colon descendens) sogar 20-fach weniger *Clec2e* Transkripte (Abbildung 11 B). Diese Erkenntnisse konnten bereits von Stefan Leibelt im Arbeitskreis Steinle beobachtet werden und wurden im Rahmen dieser Arbeit bekräftigt. Zusätzlich konnte das Darm-spezifische Expressionsmuster von *Clec2e* auch in Mäusen des Stammes BALB/c aufgezeigt werden (Abbildung 11 C). Die in der quantitativen Echtzeit-PCR verwendeten Oligonukleotide wurden bezüglich ihrer Effizienz (Daten nicht gezeigt) und Spezifität (Abbildung 11 D) überprüft. Dadurch konnte eine Amplifikation anderer Clec2 Transkripte homologer Clec2 Gene in den getesteten Geweben weitgehend ausgeschlossen werden.

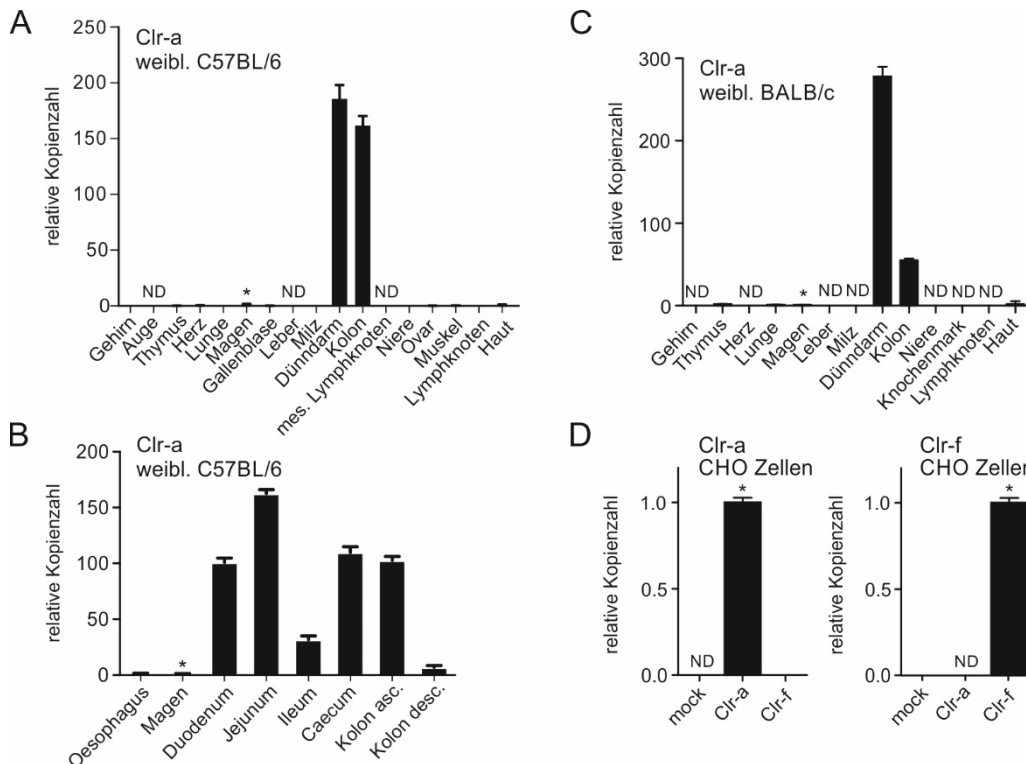


Abbildung 11. Clr-a wird ausschließlich im Darm exprimiert. Dargestellt ist die relative Häufigkeit von *Clec2e* Transkripten (A) in verschiedenen Geweben von weiblichen C57BL/6 Mäusen, (B) in unterschiedlichen Bereichen des Gastrointestinaltraktes von weiblichen C57BL/6 Mäusen, oder (C) in Geweben von weiblichen BALB/c Mäusen. (A-C) Die relative Häufigkeit der *Clec2e* Transkriptmenge wurde mittels quantitativer Echtzeit-PCR mit Clr-a spezifischen Primern bestimmt. (D) Spezifische Amplifizierung von *Clec2e* Transkripten. Die Spezifität der Primer wurde durch Amplifizierung von Transkripten in mit Clr-a oder Clr-f cDNA bzw. dem Leervektor als Kontrolle stabil transfizierten CHO Zellen mittels qPCR überprüft. Hierbei wurden für Clr-a spezifische Primer oder als Kontrolle für Clr-f spezifische Primer verwendet. (A-D) Alle Daten wurden auf 18S rRNA normiert. Die Vergleichsproben sind mit einem Sternchen (*) markiert. Ein repräsentatives von insgesamt zwei Experimenten ist gezeigt. Balken repräsentieren den Durchschnittswert \pm SD. ND = nicht detektierbar.

4.2 Produktion und Validierung von monoklonalen Clr-a Antikörpern

4.2.1 Herstellung von löslichen Clr-a Ektodomänen

Zur Produktion von Clr-a spezifischen Antikörpern wurden lösliche Clr-a Ektodomänen (lösliches Clr-a) verwendet. Die Herstellung der löslichen Clr-a Ektodomänen erfolgte durch stabile Transfektion von 293T Zellen mit einem CMV-getriebenen pSecTag2/Hygro Vektor. Dieser enthielt cDNA bestehend aus einem N-terminalen Sekretionspeptid von der V-J2-C Region der Maus Ig- κ Kette gefolgt von einer BirA Ligase-Erkennungssequenz und Teilen des Clr-a stalk-Bereiches sowie der C-terminalen Clr-a CTLD (Abbildung 12 A). Zur Detektion und für Reinigungsprozesse wurde der kodierende Bereich mit einem myc/6xHis-Tag markiert. Die Klonierung des Vektors sowie die Generierung der stabilen Zelllinien wurde durch Dr. Stefan Leibelt in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Produktion der löslichen Clr-a Ektodomänen unter Verwendung eines gegen den Myc-Tag

gerichteten Antikörpers 9E10 mittels intrazellulärer Durchflusszytometrie (Abbildung 12 B), im Immunoblot (Abbildung 12 C) und im ELISA (Daten nicht gezeigt) überprüft. Zur effizienten Produktion wurden die Clr-a sekretierenden 293T Zellen in einem Bioreaktor (CellLine 1000) kultiviert. Der gesammelte Kulturüberstand wurde anschließend über eine Metallchelataffinitätschromatografie (Ni^{2+}) und Größenausschlusschromatografie gereinigt. Ein repräsentatives Chromatogramm eines Reinigungsprozesses der Affinitätschromatografie ist in Abbildung 12 D dargestellt. Die Konzentration der gereinigten löslichen Clr-a Ektodomänen wurde nach Konzentrierung und Dialyse photometrisch bestimmt und im Coomassie-Gel überprüft (Abbildung 12 E). Unter nicht-reduzierenden Bedingungen weist das lösliche Clr-a eine molekulare Masse von knapp über 70 kDa auf. Nach Reduktion der Proteine wird die molekulare Masse auf etwa 38 kDa vermindert, was eindeutig zeigt, dass das sekretierte lösliche Clr-a als Dimer vorliegt (Abbildung 12 E). Um den Glykosylierungszustand der löslichen Clr-a Ektodomänen zu überprüfen, wurden 293T Proteinlysate mit der Endoglykosidase PNGaseF behandelt. PNGaseF spaltet die glykosidische Bindung von N-Acetylglucosamin an Asparagin in Mannose-, Hybrid- und komplexen N-verknüpften Glykoproteinen (Maley, Trimble, Tarentino, & Plummer, 1989). Nach Behandlung wird die molekulare Masse von etwa 38 kDa auf knapp 25 kDa vermindert (Abbildung 12 C). Unter Verwendung der ExPASy Software NetNGlyc (1.0 Server) wurden für Clr-a drei N-verknüpfte Glykosylierungsstellen in der CTLD vorhergesagt, was mit einer Reduktion um circa 13 kDa übereinstimmte. Zur Kontrolle wurden lösliche Clr-f Ektodomänen analysiert, die nur eine N-verknüpfte Glykosylierungsstelle in der CTLD besitzen (Leibelt et al., 2014). Von den gereinigten glykolysierten löslichen Clr-a Ektodomänen konnte etwa 1 mg gewonnen werden.

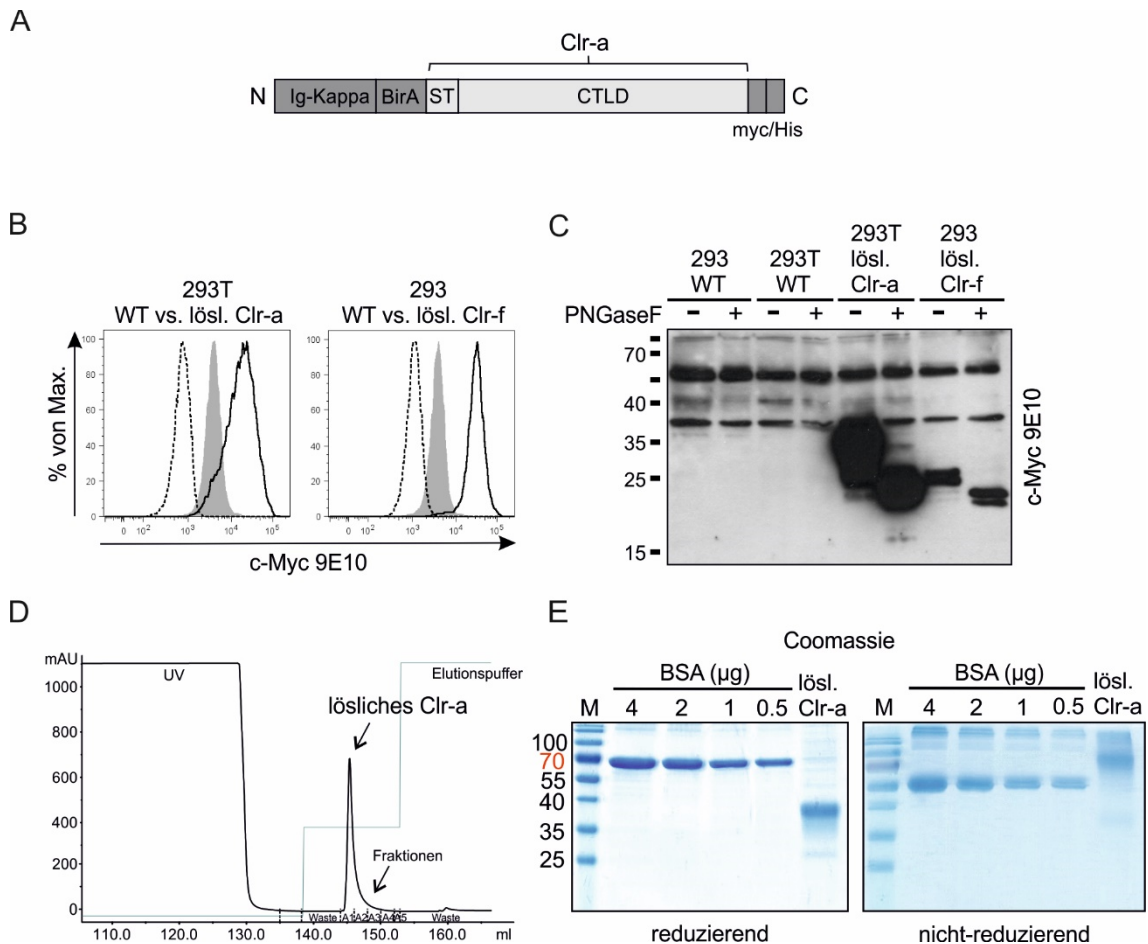


Abbildung 12. Produktion und Charakterisierung von löslichen Clr-a Ektodomänen. (A) Schematische Darstellung des pSecTag2-Hygro Vektorkonstrukte zur Herstellung löslicher Clr-a Ektodomänen. Ein Teilabschnitt des Stalk-Bereiches (ST) sowie die C-Typ Lektin-ähnliche Domäne (CTLD) von Clr-a wurden C-terminal mit einem c-myc/6xHis-Tag und N-terminal mit einem Sekretionspeptid von der V J2-C Region der Maus Ig- κ Kette (Ig- κ) und einer BirA Ligase-Erkennungssequenz (BirA) versehen. (B+C) 293T Zellen wurden stabil mit dem in (A) beschriebenem Vektorkonstrukt stabil transfiziert und durchflusszytometrisch (B) sowie im Immunoblot (C) auf Produktion der löslichen Clr-a Ektodomänen hin untersucht. 293 Zellen stabil transfiziert mit einem pSecTag2/Hygro Plasmid, das lösliches Clr-f kodiert, diente als Positivkontrolle. Parentale 293T oder 293 Zellen dienten als Negativkontrolle. (B) Intrazelluläre Detektion mit einem c-myc spezifischem mAk 9E10 gefolgt von einem APC-konjugiertem Ziege-anti-Maus Ak in transfizierten (schwarze Linie) oder parentalen (gestrichelt) Zellen aufgetragen gegen die Isotypkontrolle (grau schraffiert). (C) Detektion mit einem c-myc spezifischem mAk 9E10 gefolgt von einem HRP-konjugiertem Ziege-anti-Maus Ak in Lysaten nach elektrophoretischer Auftrennung mittels SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen. Die Proben wurden mit (+) beziehungsweise ohne (-) PNGaseF behandelt. (D) Repräsentatives Chromatogramm eines Reinigungsprozesses von löslichem Clr-a mittels Ni^{2+} -Chelataffinitätschromatografie. (E) Analyse gereinigter löslicher Clr-a Ektodomänen (2 μg geladen) unter reduzierenden (links) und nicht-reduzierenden (rechts) Bedingungen im Coomassie-Gel. Zur Mengenabschätzung wurden unterschiedliche Mengen (0,5-4 μg) an Rinderalbumin (engl. bovine serum albumin (BSA)) aufgetragen.

4.2.2 Produktion und Reinigung von monoklonalen anti-Clr-a Antikörpern

Zur Produktion von monoklonalen Clr-a spezifischen Antikörpern wurden die gereinigten löslichen Clr-a Ektodomänen zur Immunisierung von Ratten genutzt. Unter Verwendung der 1975 von César Milstein und Georges Köhler (Köhler & Milstein, 1975) entwickelten Hybridomtechnik wurden Splenozyten aus den Milzen immunisierter Ratten mit einer Myelomzelllinie (P3x63Ag8.653) fusioniert. Die daraus resultierenden Hybridome wurden in der Durchflusszytometrie auf Produktion Clr-a spezifischer Antikörper untersucht. Zur Bindungsanalyse kamen 293T Zellen zum Einsatz, die transient mit einem Clr-f_Clr-a CTLD cDNA enthaltendem pIRES2eGFP Vektor transfiziert wurden oder stabil transfizierte Clr-f_Clr-a-CTLD Hybrid exprimierende CHO Zellen. Der Grund für die Verwendung von Clr-f_Clr-a Hybridkonstrukten liegt bei einer stärkeren Oberflächenexpression von Clr-a. Darauf wird in Abschnitt 3.2.3 eingegangen. Um die Hybridome auf ihre Spezifität hin zu prüfen, wurden Leervektor transfizierte-Zellen in einem bestimmten Verhältnis mit Clr-a exprimierenden Zellen gemischt und anschließend mit den Hybridomüberständen gefärbt. Aus insgesamt sechs Fusionen konnten nur wenige Klone gewonnen werden, die beim Screening eine Clr-a spezifische Färbung aufwiesen. Die beste Detektion von Clr-a konnte mit den Überständen der drei Hybridome 2E3, 4G7 und 3C7 erzielt werden. Um einen Einzellklon zu generieren, wurden diese zunächst subkloniert und anschließend zur effizienten Produktion in einen Bioreaktor (CeLLLine CL 350 oder 1000) überführt und kultiviert. Im Falle des Hybridoms 3C7 erfolgte die Antikörperproduktion nur im Ausmaß einer T175-Zellkulturflasche, da sich die Bedingungen innerhalb des Bioreaktors, wie z. B. eine sehr hohe Zelldichte, negativ auf die Produktion des Antikörpers auswirkten. Die Bestimmung des Isotyps der Immunglobuline, die in Abbildung 13A aufgezeigt ist, ergab, dass alle drei gewonnenen Ratten-Antikörper die gleichen leichten Ketten (Kappa) besitzen, sich jedoch in dem Isotyp der schweren Kette unterscheiden. So weisen die Clr-a Ak 2E3 und 4G7 den IgG2a Isotyp auf, 3C7 hingegen besitzt schwere Ketten der Klasse IgG2b. Für den Clr-a Antikörper 3C7 sind in Abbildung 13A zwei Subklone (4A7 und 4B10) aufgezeigt. Die Bestimmung des Isotyps erfolgte mithilfe eines Kits unter Durchführung eines ELISA (siehe Material und Methoden Abschnitt 3.3.4). Die jeweiligen Hybridomüberstände wurden über einen Kultivierungszeitraum von drei Monaten gesammelt und mittels Affinitätschromatografie über eine Protein G Säule gereinigt. Protein G Säulen wurden zur Reinigung gewählt, da Ratten-Immunglobuline aller Subklassen mit Ausnahme von IgG3 an Protein G im Unterschied zu Protein A eine sehr starke Bindung aufweisen. In Abbildung 13B sind die Chromatogramme jeweils eines Reinigungsprozesses dargestellt. Die Elution der Antikörper erfolgte im sauren pH-Bereich. Dadurch wurden die gebundenen Antikörper vollständig von der Protein G Säule eluiert. Aufgrund der sehr hohen Antikörpermengen im Überstand wurden für den mAk 2E3 und 4G7 insgesamt elf Reinigungsprozesse

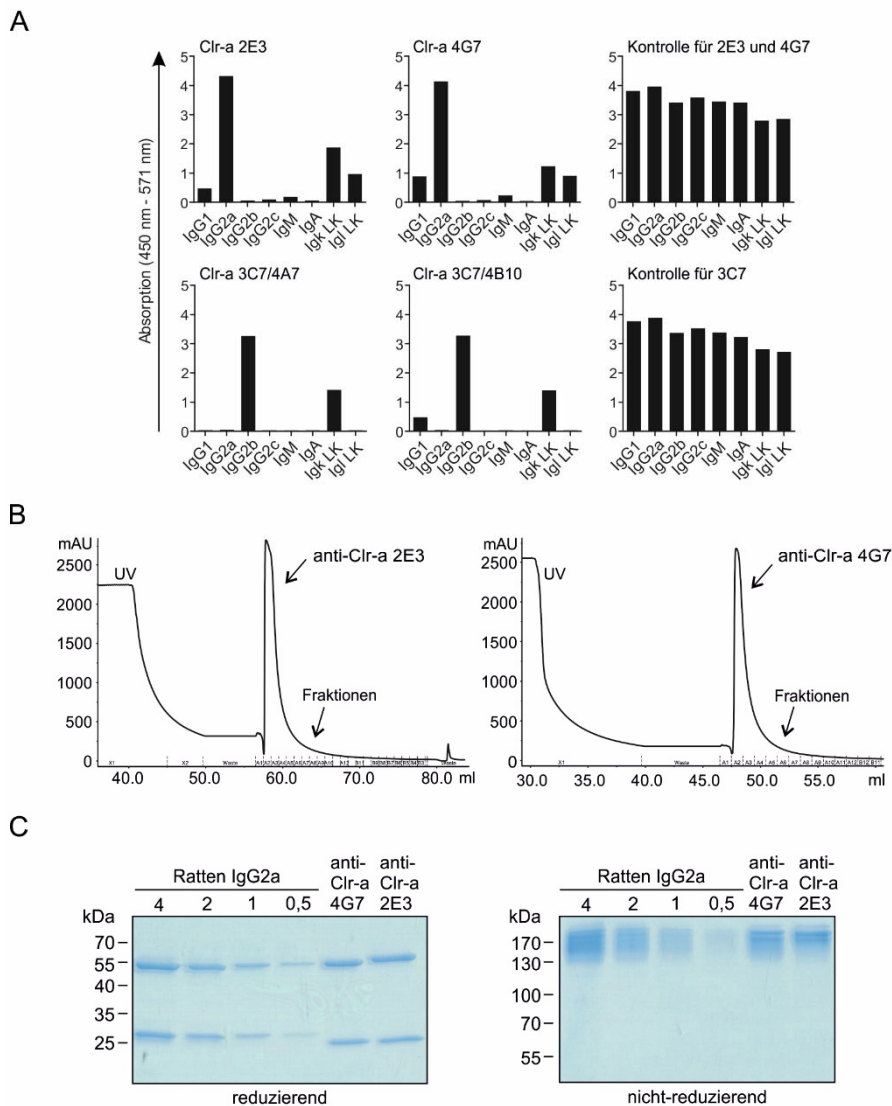


Abbildung 13. Produktion und Charakterisierung von monoklonalen Clr-a spezifischen Ratten Antikörpern. (A) Bestimmung des Isotyps der Clr-a spezifischen mAk 2E3, 4G7 und des Clr-a/Clr-f kreuzspezifischen mAk 3C7. Nach Immobilisierung von Isotyp-spezifischen Maus-anti-Ratte mAk (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c, IgM und leichte Ig-Ketten κ und λ) auf einer ELISA-Platte wurde der Hybridom-Kulturüberstand analysiert. Die Detektion erfolgte mit einem HRP-konjugierten Maus-anti-Ratte mAk durch photometrische Messung der Absorption des umgewandelten Substrats bei 450 nm. Zur Wellenlängenkorrektur wurde die Absorption bei 571 nm subtrahiert. (B) Repräsentatives Affinitätschromatogramm eines Reinigungsprozesses der mAk 2E3 und 4G7 aus dem Hybridom-Kulturüberstand über eine Protein G-Säule. Die Elution wurde photometrisch bei 280 nm verfolgt. Aufgetragen sind die UV-Absorptionseinheiten (mAU) gegen das Elutionsvolumen (ml). (C) Analyse der gereinigten spezifischen Clr-a mAk 2E3 und 4G7 (2 μ g) nach elektrophoretischer Auftrennung mittels SDS-Page unter reduzierenden (links) und nicht-reduzierenden (rechts) Bedingungen nach Visualisierung mittels Coomassie. Zur Mengenabschätzung der Ak wurde der entsprechende Isotyp Ratten IgG2a in unterschiedlichen Mengen (0,5 - 4 μ g) aufs Gel geladen.

durchgeführt, bei denen der Durchfluss immer wieder auf die Säule aufgetragen wurde. Die relevanten Proteinfractionen wurden vereint, einkonzentriert, gegen PBS umgepuffert und steril filtriert. Die Antikörperkonzentrationen wurden photometrisch bestimmt. Die Analyse der Antikörper nach

elektrophoretischer Auftrennung mittels SDS-PAGE (Abbildung 13 C) zeigt mit einer molekularen Masse von 25 kDa und 50 kDa die schweren und leichten Antikörperketten unter reduzierenden Bedingungen. Zum Vergleich wurde eine Ratten IgG2a Isotypkontrolle in unterschiedlichen Mengen aufgetragen. Die gereinigten Antikörper weisen keine Degradationsprodukte auf. Unter nicht-reduzierenden Bedingungen zeigen die Antikörper wie zu erwarten eine molekulare Masse von circa 170 kDa. Von den anti-Clr-a Antikörper 2E3 bzw. 4G7 konnten jeweils insgesamt 68 mg bzw. 60 mg gewonnen werden.

4.2.3 Validierung der monoklonalen Clr-a Antikörper 2E3 und 3C7

Im weiteren Verlauf wurden die anti-Clr-a Antikörper 2E3, 4G7 und 3C7 auf ihre Spezifität und den Einsatz als Werkzeuge in verschiedenen Methoden überprüft. Die Validierung erfolgte unter Anwendung in der Durchflusszytometrie (Abbildung 14 A-B), im Immunoblot (Abbildung 14 C-D), in der Immunfluoreszenz (nicht gezeigt) und in der Immunpräzipitation (Abbildung 15). Die Färbung von stabilen BWZ.36 Reporterzellen (Abbildung 14 A) sowie stabilen CHO Transfektanten mit den Antikörpern 2E3 und 4G7 zeigte eine eindeutige spezifische Färbung nur derjenigen Transfektanten, die FLAG/His-markierte Clr-a oder Clr-f_Clr-a CTLD Hybridkonstrukte auf der Zelloberfläche trugen. Die mit dem Leervektor transfizierten Kontrollzellen wurden nicht erkannt. Auffällig war jedoch, dass beide Antikörper im Gegensatz zur Färbung mit dem anti-FLAG mAk M2 eine deutlich schwächere Bindung an Clr-a aufwiesen, was auf eine geringe Affinität der anti-Clr-a mAk 2E3 und 4G7 hindeutete. Titrationsstudien auf Transfektanten (nicht gezeigt) ergaben, dass bei einer Färbung für die Durchflusszytometrie mit Konzentrationen von 20 µg/ml Antikörper optimale Ergebnisse erzielt werden konnten. Der Clr-a mAk 3C7 hingegen detektierte nach Färbung mit dem Hybridomüberstand nicht nur Clr-a, sondern war zudem zum nächsten Verwandten innerhalb der Clr-Familie - zu Clr-f - kreuzspezifisch (Abbildung 14 B). Letztere Beobachtung wurde nach Detektion von Clr-a und Clr-f in Lysaten von transient transfizierten 293T Zellen im Immunoblot bekräftigt (Abbildung 14 C). Zudem zeigen die Immunoblots in Abbildung 14 C+D (oben), dass die mAk 2E3 und 3C7 kein weiteres Clr Molekül aus der Clr-Familie erkennen sowohl unter reduzierenden als auch nicht reduzierenden Bedingungen. Die Expression der transient exprimierten FLAG/His-markierten Clr Moleküle Clr-a, Clr-b,

durch Detektion mit einem anti-FLAG M2 kontrolliert (unten). Proteinlysate wurden mittels SDS-PAGE unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen separiert.

wurde durch Detektion mit dem anti-FLAG M2 mAk überprüft. Da der Clr-a Ak 4G7 in der Durchflusszytometrie ein ähnliches Färbeverhalten wie der Clr-a Ak 2E3 aufwies und beide aus einem Fusionsansatz stammten, wurde der Fokus innerhalb dieser Arbeit auf den 2E3 Ak gelegt und für den Ak 4G7 nicht alle Analysen durchgeführt.

Des Weiteren wurde untersucht, ob die Ak 2E3 und 3C7 Clr-a aus Lysaten von stabil mit Clr-a transfizierten CHO Zellen immunpräzipitieren können. Obwohl das FLAG/His-markierte Clr-a Molekül mit einem anti-FLAG M2 präzipitiert und nachgewiesen werden konnte, wurde es nicht mit dem anti-Clr-a Ak 2E3 aus den Lysaten präzipitiert (Abbildung 15 A). Das Experiment wurde durch Präzipitation von Clr-f mit einem anti-FLAG M2 und dem anti-Clr-f spezifischen 10A6 kontrolliert. Abbildung 15 B stellt die Präzipitation mit dem kreuzreaktiven anti-Clr-a/anti-Clr-f 3C7 (Subklon 4A7) mAk und dessen Isotypkontrolle IgG2b dar.

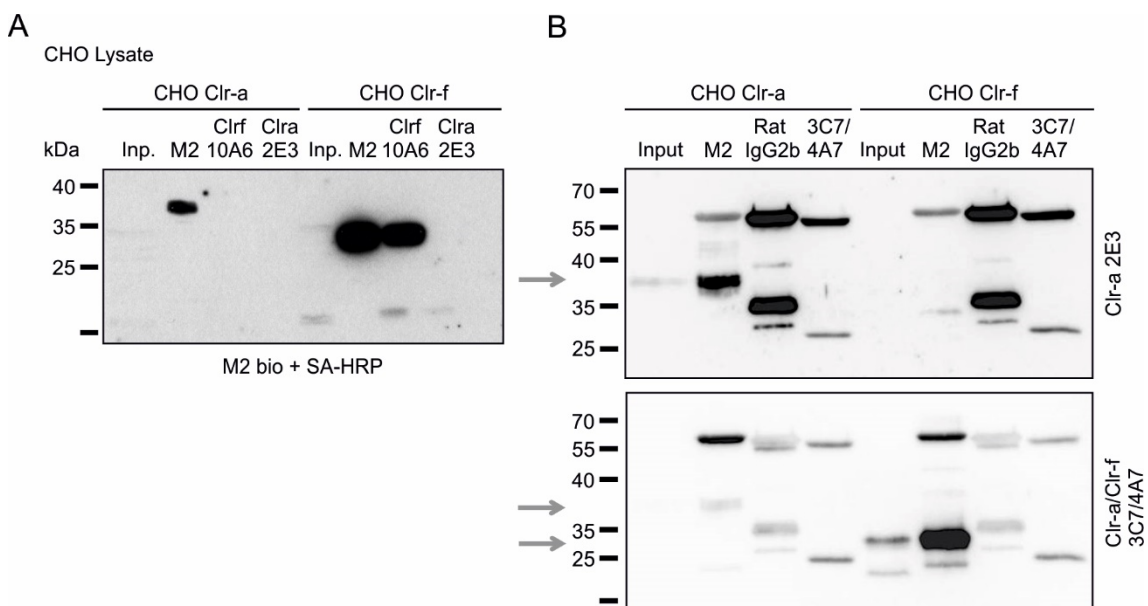


Abbildung 15. Einsatz der monoklonalen anti-Clr-a Ak 2E3 und 3C7 in der Immunpräzipitation. (A) Immunoblot nach Immunpräzipitation mit dem anti-Clr-a 2E3 mAk aus Zelllysaten von CHO Zellen, die jeweils stabil mit cDNA von carboxyterminal FLAG/His-markierten Clr-a oder Clr-f Konstrukten transfiziert wurden. Zur Kontrolle erfolgte ebenfalls Präzipitation mit einem anti-FLAG M2 und anti-Clr-f 10A6 mAk. Präzipitierte Proteine wurden mit einem biotinyliertem anti-FLAG M2 gefolgt von Streptavidin-HRP nachgewiesen. (B) Immunoblot nach Immunpräzipitation mit dem kreuzreaktiven anti-Clr-a/anti-Clr-f mAk 3C7 aus Zelllysaten von stabilen CHO Zellen, transfiziert wie unter (A) beschrieben. Zur Kontrolle erfolgte ebenfalls Präzipitation mit einem anti-FLAG M2 und dem Isotyp Ratten IgG2b. Der Nachweis präzipitierter Proteine erfolgte mit dem anti-Clr-a mAk 2E3 (oben), sekundär detektiert mit einem HRP-konjugiertem Ziege-anti-Ratte Ak. Zur Kontrolle wurden Proteine im Immunoblot nach Präzipitation mit dem anti-FLAG M2 ebenfalls mit anti-Clr-a/anti-Clr-f 3C7 analysiert (unten).

Obwohl Clr-a und Clr-f nach Präzipitation mit einem anti-FLAG M2 mit dem anti-Clr-a 2E3 (Clr-a 38 kDa; oben) und dem 3C7 (Clr-f etwa 30 kDa; unten) ersichtlich nachgewiesen werden können, konnte Clr-a nach Immunpräzipitation mit 3C7 nicht im Immunblot detektiert werden. Ein Einsatz der monoklonalen Clr-a Ak 2E3 und 3C7 ist somit in der Immunpräzipitation nicht möglich. Sie können jedoch in der Durchflusszytometrie, im Immunoblot und wie in Abschnitt 4 aufgezeigt in der Immunfluoreszenz eingesetzt werden.

4.2.4 Epitopkartierung der Clr-a Antikörper 2E3 und 3C7

Die Erkennung von Clr-a durch die Clr-a Antikörper 2E3 und 3C7 im Immunoblot lässt vermuten, dass diese ein lineares Epitop und nicht ein Konformationsepitop binden. Zur Bestätigung dieser Vermutung, wurde eine Epitopkartierung mithilfe von synthetischen Clr-a Peptiden durchgeführt. Die Peptide wurden im Arbeitskreis von Prof. Joachim Koch am Georg-Speyer-Haus synthetisiert und auf eine Membran als Spots übertragen (Abbildung 16 A). Insgesamt 123 synthetisierte Peptide mit einer Länge von jeweils 18 Aminosäuren deckten die Sequenz des gesamten extrazellulären Bereichs von Clr-a (stalk und CTLD) ab, wobei die Sequenz der benachbarten Peptide jeweils um eine Aminosäure versetzt war, sodass sich diese überlappten. Die Membran wurde mit den Clr-a Ak 2E3, 3C7 und 4G7 inkubiert und auf die Bindung bestimmter Peptide hin untersucht (Abbildung 16 A). Detektion mit dem HRP-konjugierten sekundärem Ziege-anti-Ratten IgG ohne Primärantikörper diente als Kontrolle. Anhand der Stärke der visualisierten Spots lassen sich Rückschlüsse auf die Bindung der Ak und somit die Länge der jeweiligen Epitope ziehen. Wie erwartet erkennen alle drei Ratten-Antikörper ein lineares Epitop. Für den Clr-a 2E3 Ak wurde die Aminosäureabfolge „LTRGGGECAY“ und für den kreuzreaktiven Clr-a 3C7 „ESSEHPWIW“ im Clr-a Molekül und „ASTQHPWIW“ bei Clr-f als Epitop ermittelt. Anti-Clr-a 4G7 besitzt wie anhand der Durchflusszytometrie zu erwarten war das gleiche Epitop wie 2E3. Beide Epitope befinden sich in der CTLD von Clr-a und sind zur besseren Veranschaulichung in Abbildung 16 B in einer Sekundärstruktur-Darstellung der Clr-a CTLD präsentiert. Diese wurde anhand der dimeren Struktur der Clr-g CTLD (Skalova et al., 2012) mithilfe des Programms Swiss Model (Arnold, Bordoli, Kopp, & Schwede, 2006; Guex, Peitsch, & Schwede, 2009) modelliert.

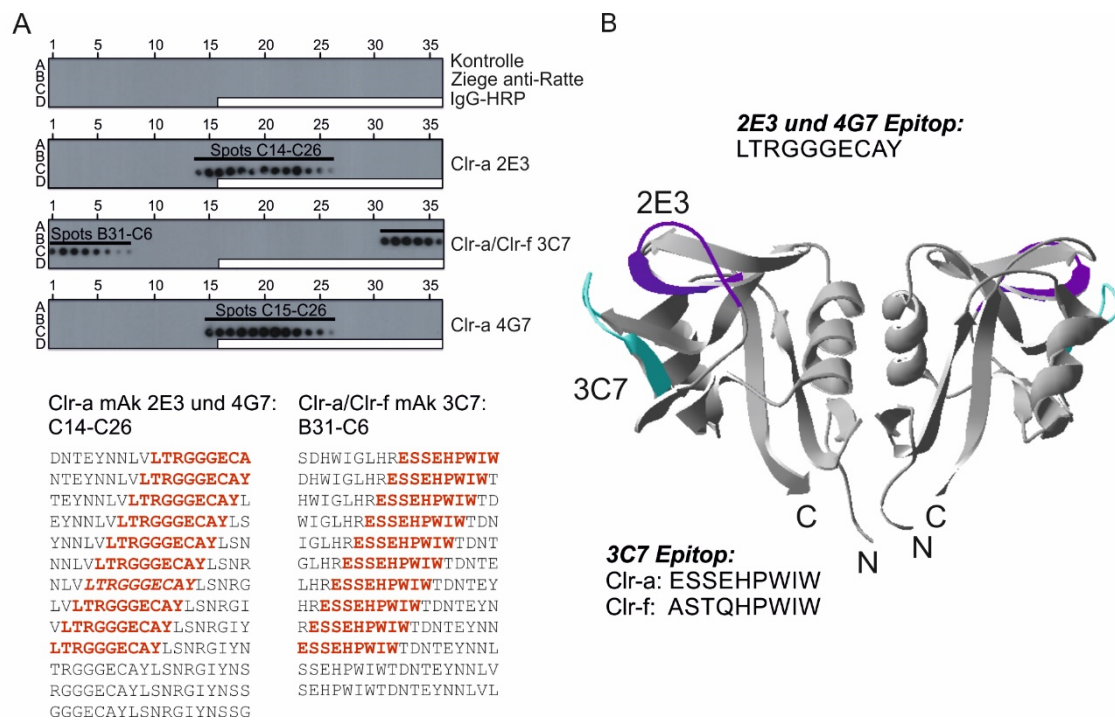


Abbildung 16. Identifizierung der Epitope der mAk Clr-a 2E3 und 4G7 sowie des Clr-a/Clr-f kreuzreaktiven mAk 3C7. (A) Synthetisierte Clr-a Peptide, welche den gesamten extrazellulären Bereich von Clr-a abdecken, jeweils versetzt um eine Aminosäure, wurden als Spots auf eine Membran übertragen (oben). Detektion mit den monoklonalen Clr-a Antikörpern gefolgt von HRP-konjugierten Ziege-anti-Ratten IgGs offenbarte die linearen diskontinuierlichen Clr-a Epitope. Anhand der Nummerierung konnten die Spots den jeweiligen Peptidsequenzen zugeordnet werden (unten). In den Reihen A-D: Reihe A-C, Spot 1-36; Reihe D, Spot 1-15. (B) Darstellung der linearen Epitope der spezifischen Clr-a Aks 2E3 und 4G7 (violett) sowie des kreuzreaktiven Clr-a/Clr-f Ak 3C7 (hellgrün) in der CTLD von Clr-a präsentiert als Sekundärstruktur. Struktur wurde modelliert basierend auf der dimeren CTLD Struktur von Clr-g mithilfe des Swiss Model Programms und des Pdb-Viewer 4.1.0. N und C Termini beider Ketten sind gekennzeichnet.

4.3 Molekulare Charakterisierung von Clr-a in vitro

4.3.1 Clr-a wird als glykosyliertes Homodimer auf der Zelloberfläche exprimiert

Um die molekularen Eigenschaften von Clr-a zu beschreiben, wurde nun der potenzielle offene Leserahmen des *Clec2e* Gens aus intestinaler Dünndarm cDNA abgeleitet und die ektope Expression durchflusszytometrisch als auch im Immunoblot in 293T und CHO Zellen analysiert (Abbildung 17). Im Rahmen seiner Diplomarbeit klonierte Stefan Leibelt in der Arbeitsgruppe Steinle bereits die *Clec2e* cDNA in den RSV-Promoter getriebenen Vektor RSV.5 neo. Dieser enthielt die kodierenden Sequenzen für einen carboxyterminalen FLAG-Protein-Tag (engl. Tag=Markierung) gefolgt von einem 6xHis-Protein-Tag, sodass eine Markierung des zu exprimierenden Proteins mit einem gegen den jeweiligen Tag gerichteten spezifischen Antikörper ermöglicht wurde. Dieser Vektor wurde stabil in CHO-Zellen eingebracht. Für eine transiente Proteinexpression wurde im Rahmen dieser Arbeit zudem die kodierende *Clec2e* Sequenz aus dem oben beschriebenen Vektor in einen CMV-Promoter getriebenen

pIRES2-EGFP Vektor kloniert und zur Markierung ebenfalls mit einem FLAG-Tag versehen. Die inserierte Sequenz wurde mittels Sequenzierung auf Korrektheit überprüft. Der pIRES2-EGFP Vektor enthält eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES-site) des ECMV (Encephalomyocarditis)-Virus zwischen der multiplen Klonierungsstelle und dem EGFP Protein, welche die Bindung der Ribosomen an die mRNA ohne Initiationsfaktoren ermöglicht. Dadurch wird das zu analysierende Protein wie auch EGFP von einer einzelnen bicistronischen mRNA translatiert, sodass eine Überprüfung der Transfektionseffizienz ermöglicht und die Selektion stabiler Zellklone vereinfacht wird. Der *Clec2e* cDNA enthaltende pIRES2-EGFP Vektor wurde transient in 293T Zellen eingebracht und Clr-a im Immunoblot nach einer SDS-PAGE unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen mittels des spezifischen Clr-a Ak 2E3 untersucht. Des Weiteren wurde das Proteinlysate mit PNGaseF behandelt, um den Glykosylierungszustand von Clr-a zu überprüfen. Wie in Abbildung 17A dargestellt offenbarte die unbehandelte Probe, dass FLAG-markiertes Clr-a unter reduzierenden Bedingungen eine molekulare Masse zwischen 35-40 kDa besitzt. Nach Behandlung mit PNGaseF wurde die molekulare Masse auf etwa 25 kDa reduziert, was unter Berücksichtigung des FLAG-Tags der erwarteten molekularen Größe entsprach. Die molekulare Masse von Clr-a wurde in der UniProtKB Datenbank mit 23,95 kDa (Stand 11.05.2016) angegeben. Zudem wurden mit der ExPASy Software NetNGlyc (1.0 Server) drei N-verknüpfte Glykosylierungsstellen in der CTLD von Clr-a vorhergesagt, was mit einer Reduktion um 10-15 kDa übereinstimmte. Unter nicht reduzierenden Bedingungen wies Clr-a eine zweifache molekulare Größe von 70-80 kDa auf, welche nach PNGaseF Verdau auf etwa 50 kDa reduziert wurde. Aus der Sensitivität gegenüber des Reduktionsmittels ließ sich schließen, dass Clr-a als Homodimer vorliegt. Analyse der stabil transfizierten CHO Zellen führten zu ähnlichen Ergebnissen (Abbildung 17 B). Außerdem ergaben Messungen am Durchflusszytometer (Abbildung 17 C) nach Bindung eines FLAG-Antikörpers, dass Clr-a Glykoproteine deutlich auf der Oberfläche von stabil transfizierten CHO und transient transfizierten 293T exprimiert wurden. Somit vermitteln diese Experimente eindeutig, dass Clr-a nach ektopter Expression als ein disulfid-verknüpftes glykosyliertes Homodimer auf der Zelloberfläche erscheint.

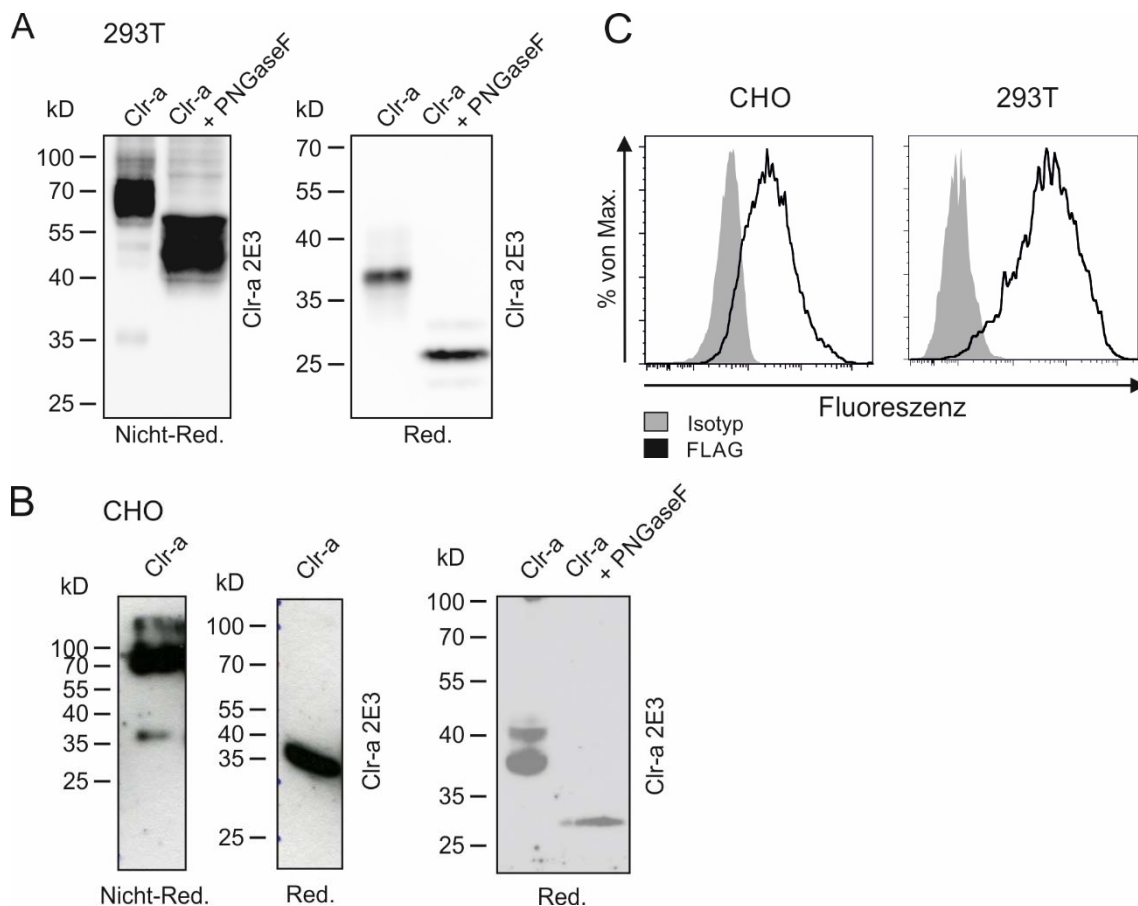


Abbildung 17. Clr-a ist ein disulfid-verknüpftes homodimeres Glykoprotein auf der Zelloberfläche. (A-C) 293T und CHO Zellen wurden transient (293T) oder stabil (CHO) mit *Clec2e* cDNA transfiziert und im Immunoblot (A+B) sowie in der Durchflusszytometrie (C) analysiert. Zur transienten Transfektion wurde ein pIRES2_eGFP-FLAG Vektor verwendet. Die stabile erfolgte mit einem RSV.5 neo-FLAG/6xHis Vektor. (A+B) Zellysate wurden nicht behandelt oder mit PNGaseF deglykosyliert und unter nicht-reduzierenden und reduzierenden Bedingungen mittels SDS-PAGE separiert. Zur Detektion wurde der Clr-a spezifische mAb 2E3 verwendet. (C) Clr-a Expression auf CHO (links) und 293T (rechts) Zellen. Detektion erfolgte mit einem anti-FLAG mAb M2 (schwarze Linie) mit der entsprechenden Isotypkontrolle (grau schraffiert).

4.3.2 Intrazelluläre Retention von Clr-a Molekülen

4.3.2.1 Vergleich der Oberflächenexpression von Clr-a innerhalb der Clec2-Familie

Bei der Charakterisierung der unterschiedlichen Mitglieder der Clr-Familie durch Dr. Stefan Leibelt innerhalb der Arbeitsgruppe Prof. Steinle konnte vergleichend mit den anderen Clr Molekülen eine relativ geringe Präsenz von Clr-a auf der Zelloberfläche beobachtet werden. Diese Beobachtung wurde im Rahmen dieser Arbeit bestätigt. Die Analyse der Oberflächenexpression erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Hierfür wurden stabil transfizierte CHO Zellen verwendet, die mit dem RSV-Vektor, welcher die cDNA diverser FLAG/6xHis-markierter Clr Moleküle enthielt, bereits zuvor durch Stefan Leibelt stabil transfiziert wurden. Dabei konnte mit einem anti-FLAG Antikörper bei Clr-a die geringste Oberflächenexpression ersehen werden (Abbildung 18 A), unabhängig davon, dass nur ein

geringer Anteil der Zellen Clr-a exprimierten. Dies wirft die Frage nach einem möglichen regulatorischen Mechanismus auf, da Clr-f als nächster Verwandter von Clr-a, deutlich stärker und ähnlich zu den anderen Clr Molekülen auf der Zelloberfläche exprimiert wird. Um auszuschließen, dass diese Beobachtung auf einer unterschiedlichen Transfektionseffizienz basierte, wurden zudem 293T Zellen mit Clr-a und Clr-f im pIRES2-EGFP Vektor transient transfiziert und mittels

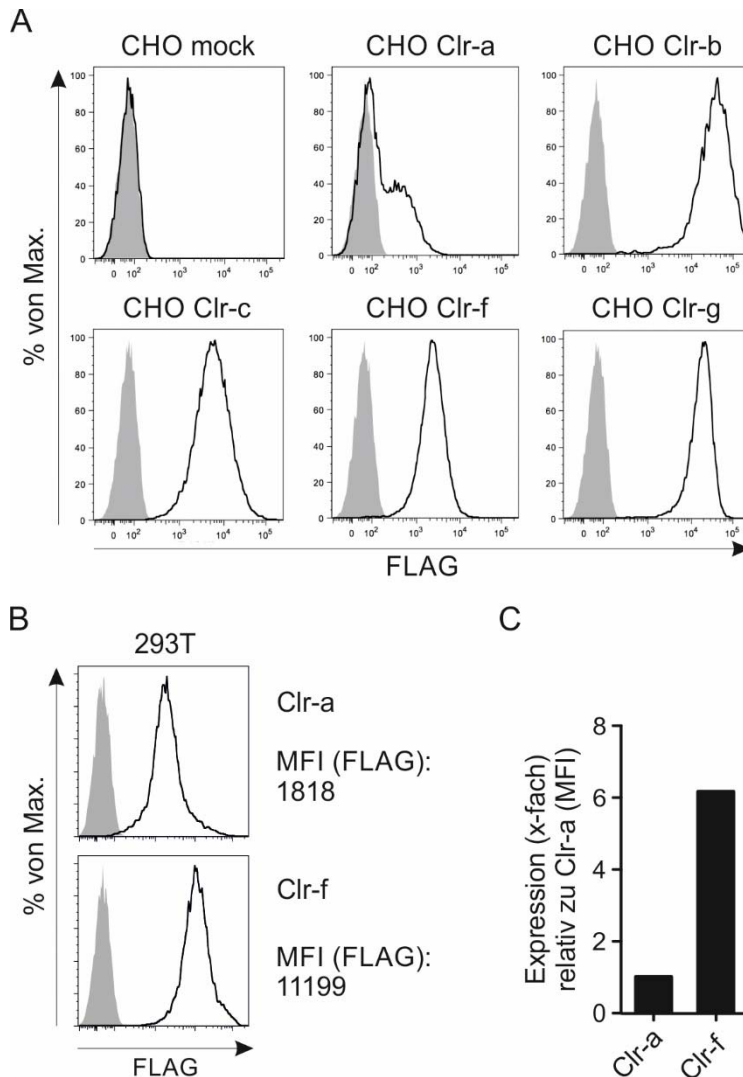


Abbildung 18. Clr-a weist eine schwächere Zelloberflächenexpression im Vergleich zu Clr-f auf. (A) Analyse der Oberflächenexpression der Clr Familienmitglieder auf CHO Zellen, die mit unterschiedlicher FLAG/6xHis-Tag versehender *Clec2* cDNA stabil transfiziert wurden. Die Detektion erfolgte mit einem anti-FLAG M2 Ak (schwarze Linie) sowie der Isotypkontrolle (grau schraffiert) in der Durchflusszytometrie. (B+C) Reduzierte Oberflächenexpression von Clr-a auf mit *Clec2e* oder *Clec2h* cDNA transient transfizierten 293T Zellen im Vergleich zu Clr-f. (B) Zur Detektion wurde ein anti-FLAG M2 Ak genutzt (schwarze Linie) sowie die Isotypkontrolle (grau schraffiert). (C) X-fache Oberflächenexpression von Clr-f relativ zu Clr-a. Die Berechnung basiert auf der in (B) dargestellten medianen Fluoreszenzintensität (MFI). Abgebildet ist ein repräsentatives von mindestens fünf unabhängigen Experimenten.

Durchflusszytometrie analysiert. Bei der Messung GFP-positiver Zellen konnte bekräftigt werden, dass Clr-a im Vergleich zu Clr-f trotz der Homologie eine 6-fach geringere Expression auf der Zelloberfläche aufwies (Abbildung 18 B+C).

4.3.2.2 Clr-a weist eine hohe Sensitivität für Endoglykosidase H auf

Um die Frage nach einem regulatorischen Mechanismus bezüglich der schwachen Oberflächenpräsenz von Clr-a experimentell zu adressieren, wurden zunächst Lysate von transient transfizierten 293T mit Endoglykosidase H (EndoH) behandelt und im Immunoblot näher untersucht (Abbildung 19 A). EndoH spaltet zwischen zwei N-Acetylglucosamineinheiten N-verknüpfte Mannoseeinheiten nicht komplexer Glykoproteine ab. Dieser Vorgang ist möglich, solange das Protein im Reifungsprozess N-verknüpfter Polysaccharide im Golgi-Apparat noch mindestens fünf Mannoseeinheiten besitzt (high-mannose). Nach Abspaltung zwei weiterer Mannoseeinheiten im medialen Golgi durch Mannosidase II um weitere Saccharide anzuhängen, kann eine Spaltung durch EndoH nicht mehr erfolgen. Somit kann anhand der EndoH Sensitivität der Glykosylierungsprozess und der Proteintransport verfolgt werden (Freeze & Kranz, 2010; Maley et al., 1989; Trimble & Tarentino, 1991). Der Nachweis mit dem Clr-a/Clr-f spezifischen 3C7 Ak ließ erkennen, dass die Mehrheit der Clr-a Moleküle sensitiv gegenüber EndoH ist, wohingegen Clr-f eine prominente EndoH-resistente Bande aufwies. Durch Quantifizierung der Bandenstärke (Abbildung 19 B) wurde berechnet, dass etwa 85 % der Clr-a Moleküle EndoH sensitiv waren und somit nicht über die cis-Seite des Golgi-Komplexes passiert waren und nicht als vollständig prozessiertes, matures Glykoprotein an die Oberfläche gelangten. Genau umgekehrt verhielt sich das Verhältnis bei Clr-f, wo nahezu 80 % resistent gegenüber dem EndoH Verdau waren. Diese Daten korrelierten mit dem Expressionsniveau auf der Zelloberfläche (Abbildung 19 B+C). In Übereinstimmung mit einer geringeren Clr-a Oberflächenexpression geht eine hohe EndoH-Sensitivität einher. Somit liefern diese Ergebnisse eine Erklärung für die geringere Oberflächenexpression und deuten auf eine intrazelluläre Retention von Clr-a hin.

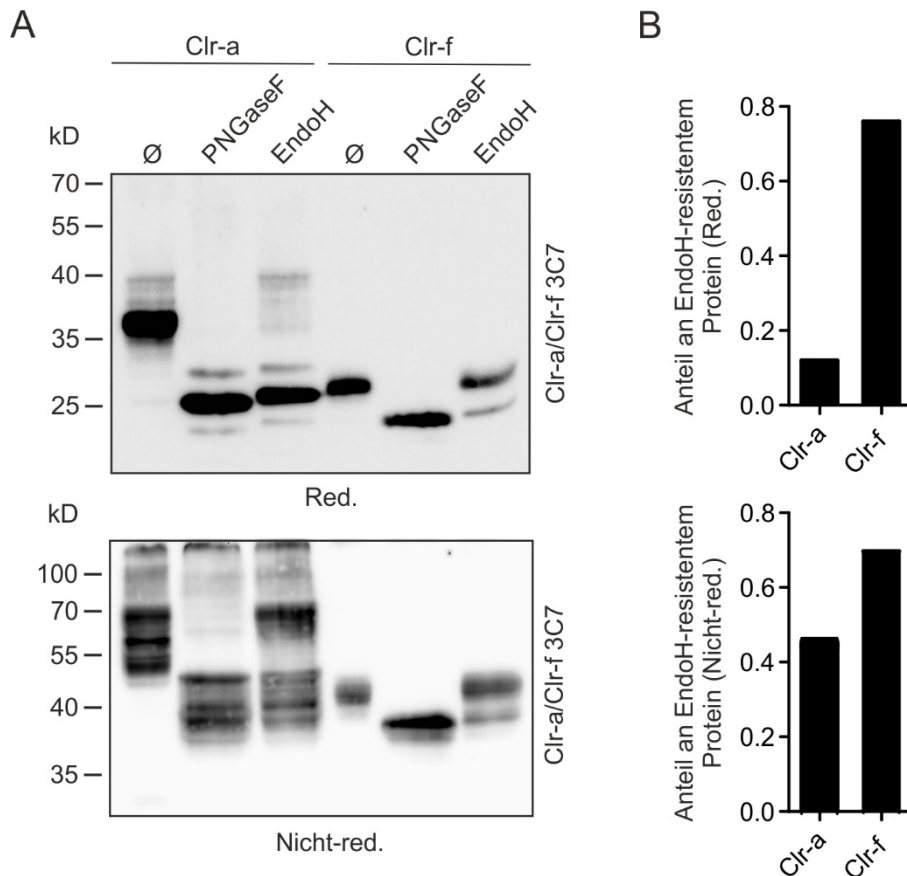


Abbildung 19. Intrazelluläre Retention des Clr-a Glykoproteins. (A) Analyse der Clr Expression in Zelllysaten von 293T transient transfiziert mit FLAG/6xHis-Tag markierter Clr-a oder Clr-f cDNA. Die Zelllysate wurden unbehandelt belassen oder mit PNGaseF oder EndoH behandelt und elektrophoretisch unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen getrennt. Zur Visualisierung der Clr Moleküle wurde der kreuzreaktive Clr-a/Clr-f mAk verwendet. (B) Prozentualer Anteil der entsprechenden EndoH-resisten Clr Glykoproteine, der nach Quantifizierung der Bandenstärke ermittelt wurde.

4.3.2.3 Identifizierung von Retentionsmotifen anhand von Domänen austausch- und Mutageneseexperimenten

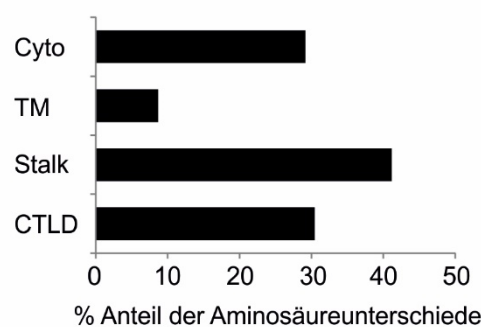
Unter Betracht der im Vergleich zu Clr-f verminderten Clr-a Präsenz auf der Zelloberfläche einhergehend mit einem hohen Anteil an intrazellulärem Endo-H sensitivem Protein, wurde im Folgenden analysiert, ob bestimmte Sequenzbereiche innerhalb von Clr-a mögliche Retentionsmotife darstellen. Beim Vergleich der Aminosäuresequenz beider Moleküle war auffällig, dass die stärkste Aminosäurediversität im letzten Bereich der carboxyterminalen CTLD vorherrschte (Abbildung 20 A+C). Betrachtete man die Unterschiede innerhalb der einzelnen Domänen näher, so bildete der „stalk“-Bereich mit 40 % die höchste Varianz. Die Transmembrandomänen mit einer Länge von 23 Aminosäuren sind mit nur zwei Unterschieden nahezu identisch (Abbildung 20 A+B). Zur experimentellen Identifizierung der Retentionsmotife wurden 293T Zellen transient mit unterschiedlichen Clr-a/Clr-f cDNA Hybridkonstrukten im pIRES2 eGFP Vektor transfiziert und

durchflusszytometrisch auf die Oberflächenexpression hin untersucht. Zur Detektion der Hybridmoleküle innerhalb der transfizierten und somit eGFP-positiven Zellpopulation wurden diese mit einem FLAG-Tag versehen. Zur Kontrolle wurde eine Färbung der Zellen mit dem Isotyp durchgeführt. Die einzelnen Konstrukte wurden jeweils ausgehend vom pIRES2 eGFP Clr-a oder pIRES2 eGFP Clr-f Vektor mittels restriktionsfreier Klonierung und ortsspezifischer Mutagenese erstellt (Abschnitt Methoden 3.1.6). In Abbildung 21 A sind repräsentativ Histogramme zweier unterschiedlicher Experimente dargestellt, in Abbildung 21 D-G sind alle Versuchsansätze zusammengefasst. Zur Veranschaulichung sind alle Hybridkonstrukte in Abbildung 22 schematisch abgebildet.

A



B



C

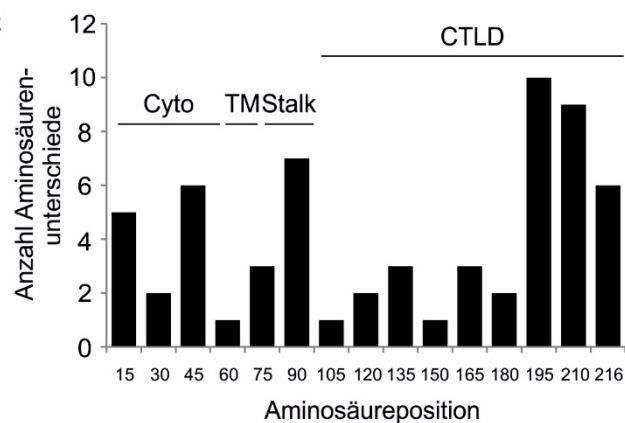


Abbildung 20. Vergleich der Clr-a und Clr-f Aminosäuresequenzen. (A) Gegenüberstellung der Clr-a und Clr-f Aminosäuresequenz. Unterschiede sind in rot hervorgehoben, konservierte Cysteinreste in grau markiert und das „WIGL“-Motif ist mit einem Sternchen gekennzeichnet (*). Cyto = cytoplasmatische Region, TM= Transmembrandomäne, CTLD = C-Typ Lektin-ähnliche Domäne. (B) Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Unterschiede in der AS-Sequenz in den einzelnen Proteindomänen. (C) Gezeigt wird die Anzahl der AS-Unterschiede verglichen mit Clr-f innerhalb der gesamten Clr-a Sequenz in jeweils 15 AS-Schritten

Wie in Abschnitt 4.3.2.1 alle Experimente eindeutig zeigten, wurde Clr-a im Vergleich zu Clr-f im Durchschnitt etwa 5-fach schwächer auf der Zelloberfläche exprimiert (Abbildung 18 B+C). Die Insertion einzelner Clr-f Domänen in Clr-a zeigte zunächst entgegen der Erwartung, dass das Einbringen der CTLD nicht in einer höheren Oberflächenexpression resultierte. Umgekehrt wurde ein ähnliches Ergebnis beobachtet: Das Einbringen der Clr-a CTLD ins Clr-f Molekül beeinträchtigte nicht die Clr-f Oberflächenpräsenz (Abbildung 21 A+D). Die cDNA der Hybridkonstrukte Clr-f_Clr-a CTLD sowie Clr-a_Clr-f CTLD wurden bereits zuvor von S. Leibelt in den RSV-Vektor kloniert und im Rahmen dieser Arbeit in den pIRES2 eGFP Vektor eingebracht. Im Gegensatz zu den CTLD Substitutionen führen Substitutionen des gesamten stalk-Bereiches oder der vollen cytoplasmatischen Domäne bis zu einer 4-fachen (stalk-Bereich) beziehungsweise 2,5-fachen (cytoplasmatischer Bereich) Zunahme der Expression der Hybridmoleküle auf der Zelloberfläche. Der Austausch beider Domänen (Clr-f_Clr-a) resultierte sogar in einem Expressionsniveau des Hybridmoleküls (5,5-fach), welches dem von Clr-f ähnelte. Wie erwartet konnte bei der Substitution der Clr-a Transmembrandomäne, dessen Aminosäuresequenz zu Clr-f nur 10 % Unterschied aufweist, keine Änderung des Expressionsverhaltens des Hybridproteins auf der Oberfläche beobachtet werden. Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass sowohl der stalk-Bereich als auch Teile der cytoplasmatischen Region an der verminderten Clr-a Oberflächenexpression beteiligt sind. Durch Substitution von vier einzelnen cytoplasmatischen Teilabschnitten (Clr-a_Clr-f Cyto.1-Clr-a_Clr-f Cyto.4) konnte der für die Retention verantwortliche Bereich auf eine Länge von 14 Aminosäuren (Cyto.3, AS 28-41) eingegrenzt werden. Durch diesen Austausch konnte eine 5-fach höheres und somit zu Clr-f identisches Expressionsniveau erzielt werden. Innerhalb dieses Teilabschnittes wurde Alanin an AS-Position 35 als ein Bestandteil des Retentionsmotifs identifiziert. Eine Mutation zu Glycin, welches an dieser Stelle in Clr-f vorzufinden ist, führte zu einer 3,5-fach höheren Oberflächenexpression, wohingegen die umgekehrte Mutation von Glycin zu Alanin zu einer erheblichen Reduktion des Clr-f Glykoproteins an der Oberfläche führte. Diese Ergebnisse spiegeln die besondere Bedeutung dieser Aminosäure im cytoplasmatischen Bereich für die Clr-a Oberflächenexpression wider. Um zu überprüfen, ob sich in

der stalk-Region ebenso nur bestimmte Bereiche an der Clr-a Retention beteiligen, wurden auch in

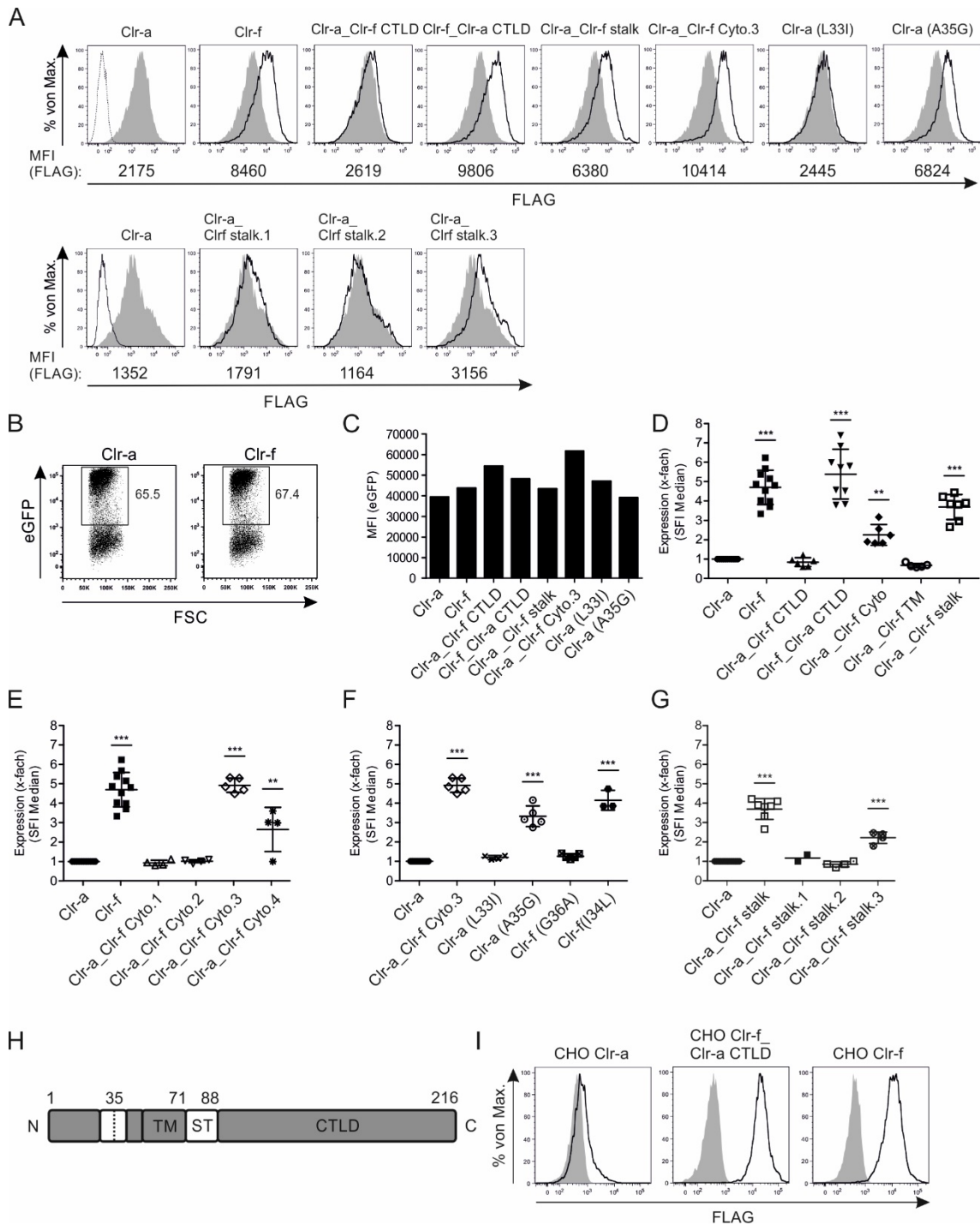


Abbildung 21. Stalk-Bereich und cytoplasmatischer Proteinanteil sind für Regulation der Clr-a Oberflächenexpression verantwortlich. (A) Repräsentative Histogramme von 293T Zellen, welche mit cDNA von diversen carboxyterminal FLAG-markierten Clr-a/Clr-f Hybridkonstrukten (siehe auch Abb.3) transient transfiziert und mit einem anti-FLAG mAb M2 detektiert wurden (schwarze Linie). Zum Vergleich ist die M2 Färbung von Clr-a überlagert (grau schraffiert). Isotyp-Kontrolle ist repräsentativ für alle Färbungen nur bei Clr-a aufgezeigt (gestrichelte Linie). (B) Repräsentative Dot Plots stellen ähnliche Transfektionseffizienzen (eGFP) der bicistronischen Clr Hybridkonstrukte, welche in (A) analysiert wurden, dar. (C) Im Balkendiagramm werden die medianen Fluoreszenzintensitäten der in (C) eingegrenzten und somit in (A) analysierten eGFP positiven Zellen gezeigt. (D-G) Spezifischer Fluoreszenz Index (engl. specific fluorescence index (SFI)) der medianen

Fluoreszenzintensität der verschiedenen Clr-a/Clr-f Hybridkonstrukte im Vergleich zur Clr-a Oberflächenexpression. Die Clr-a/Clr-f Hybridkonstrukte wurden mit einem M2 mAk auf transfizierten 293T Zellen gefärbt. Gezeigt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung von insgesamt 2-11 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten pro Konstrukt. Zum Vergleich wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit einem Dunnett Post-Test ($p < 0,05$, $**p \leq 0,01$, $***p \leq 0,001$) durchgeführt. (D) Clr-a/Clr-f Hybridkonstrukte, bei denen der gesamte Bereich der extrazellulären (CTLD), stalk, Transmembran- (TM) und cytoplasmatischen Domäne (Cyto) ausgetauscht wurde. (E) Sukzessiver, partieller Austausch (Cyto.1 bis Cyto.4) der ganzen cytoplasmatischen Domäne von Clr-a durch entsprechende Sequenzen von Clr-f. (F) Punktmutationen in der cytoplasmatischen Domäne von Clr-a und Clr-f jeweils an den Positionen 33/34 und 35/36. (G) Sukzessiver, partieller Austausch (stalk.1 bis stalk.3) der stalk Domäne von Clr-a durch entsprechende Sequenzen von Clr-f. (H) Schematische Darstellung der Struktur des Clr-a Proteins mit Positionen/ Regionen (stalk-Bereich und Alanin an Position 35 in cytoplasmatischer Domäne; weiß markiert), die zu einer reduzierten Oberflächenexpression beitragen. Eine detaillierte Darstellung aller Hybridmoleküle ist in Abbildung 22 aufgezeigt. (I) Repräsentative Histogramme von CHO Zellen, welche mit cDNA von carboxyterminal FLAG-markierten Clr-a (links), Clr-f (rechts) und Clr-a/Clr-f (Mitte) Hybridkonstrukten stabil transfiziert und mit einem anti-FLAG mAk M2 detektiert wurden (schwarze Linie). Die Isotyp-Kontrolle ist grau schraffiert.

diesem Bereich Punktmutationen eingebracht. Diese Experimente offenbarten, dass der carboxyterminale stalk-Abschnitt einen Einfluss auf die Clr-a Retention hatte. Jedoch konnte durch Substitution des letzteren nicht das Expressionsniveau erreicht werden wie beim Austausch der gesamten stalk-Region. Daraus lässt sich schließen, dass der gesamte stalk-Bereich als Retentionsmotif dient. Um sicherzustellen, dass die Varianz in der Oberflächenexpression nicht durch eine unterschiedliche Transfektionseffizienz verursacht wird, wurde zudem der prozentuale Anteil der GFP positiven Zellen als auch die Expression von eGFP von bestimmten Hybridmolekülen dargestellt (Abbildung 21 B+C). Repräsentativ wird anhand von Clr-a und Clr-f eindeutig gezeigt, dass die Transfektionseffizienz beider Hybridkonstrukte nahezu identisch war. Bei der eGFP Expression können ebenso nur marginale Unterschiede beobachtet werden. Zusammenfassend wird hier gezeigt, dass sowohl ein bestimmter Bereich in der cytoplasmatischen Region als auch der stalk-Bereich für die Clr-a Retention und im Vergleich zu Clr-f stark verminderte Oberflächenexpression verantwortlich ist (Abbildung 21 H). Neben der transienten Expression in 293T Zellen, konnte ebenso nach stabilem Einführen eines Hybridkonstruktes im RSV-Vektor in CHO Zellen, bei welchem beide für die Retention notwendigen Abschnitte durch diejenigen von Clr-f ersetzt wurden, eine verstärkte Oberflächenexpression erzielt werden (Abbildung 21 I).

A

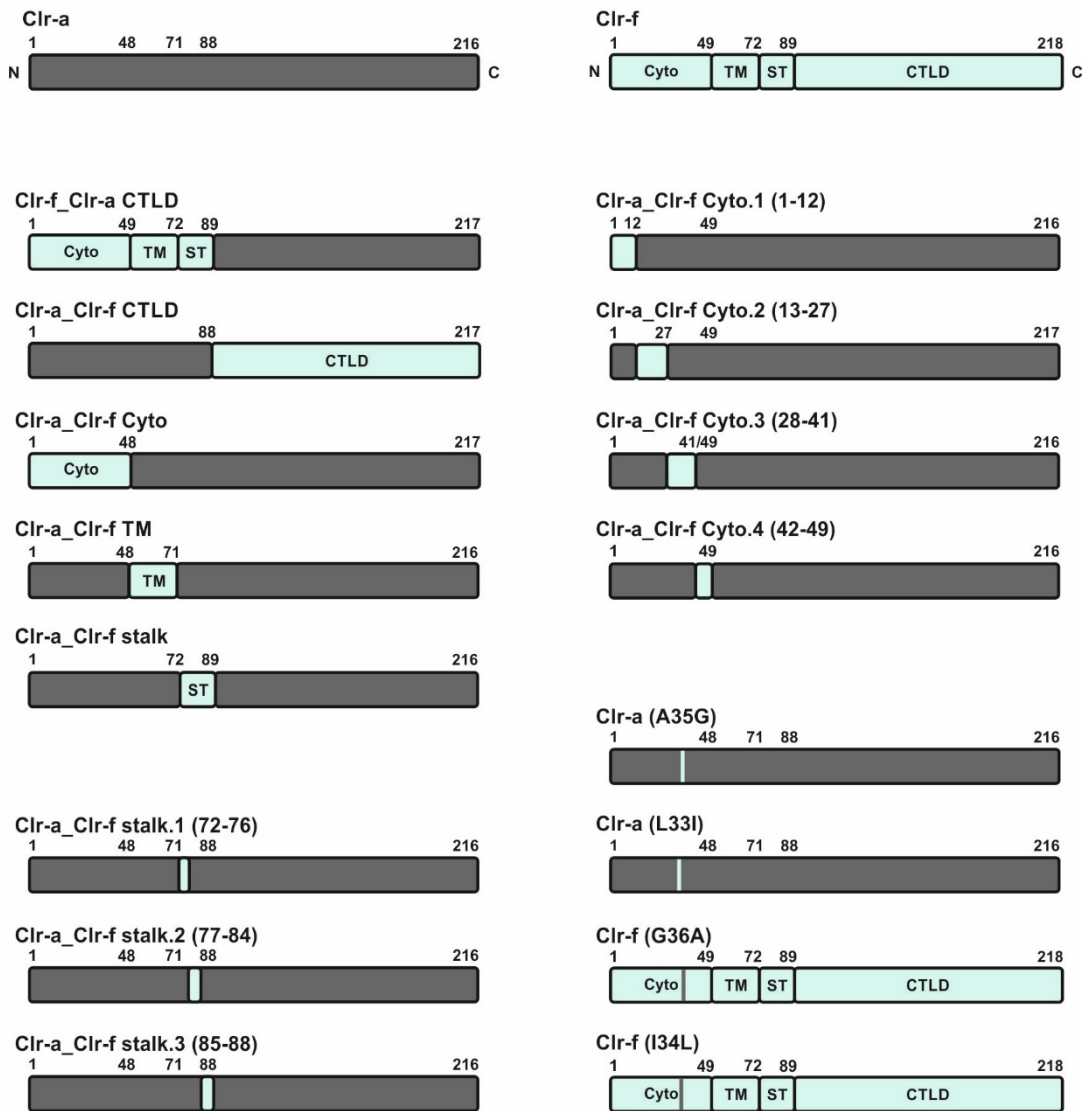


Abbildung 22. Schematische Darstellung der Clr-a/Clr-f Hybridproteine. Clr-a Sequenzen sind in grau und Clr-f Sequenzen in hellgrün dargestellt. Die Zahlen geben die letzte Aminosäureposition in der jeweiligen Proteindomäne beziehungsweise des mutierten Bereiches (Clr-a-Clr-f Cyto.1–Clr-a_Clr-f Cyto.4) an. ST= stalk-Region.

4.4 Spezifische Clr-a Expression von intestinalen Epithelzellen

Die aus den in vitro Studien gewonnenen Daten motivierten nun die Lokalisation und die molekularen Eigenschaften von Clr-a unter physiologischen Bedingungen näher zu beschreiben. Unter Berücksichtigung der in Abschnitt 1 erzielten Ergebnisse, die eine selektive Expression des *Clec2e* Gens im Gastrointestinaltrakt offenbarten, wurden nun bestimmte Zellpopulationen aus dem Dünndarm von C57BL/6 Mäusen mittels Echtzeit-PCR auf das Vorhandensein von *Clec2e* Transkripten analysiert. Die präparierten Dünndarmzellen wurden mit Antikörpern gegen CD45.2 und gegen das epitheliale Zelladhäsionsmolekül (EpcAM; CD326) markiert und mittels Durchflusszytometrie in hoher Reinheit sortiert (Abbildung 23 A).

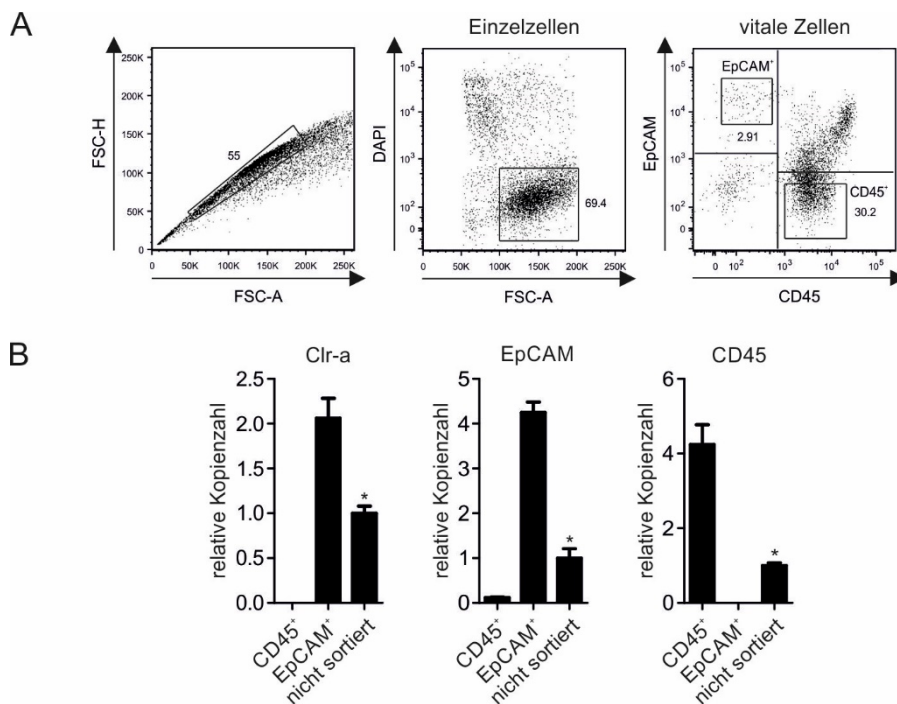


Abbildung 23. Clr-a Expression in intestinalen EpCAM-positiven Epithelzellen. (A) Dargestellt in die Gating-Strategie zur Sortierung von vitalen CD45⁺ EpCAM⁺ sowie CD45⁻ EpCAM⁺ intestinalen Zellen aus dem Dünndarm von C57BL/6 Mäusen. (B) Relative Häufigkeit der *Clec2e* Transkripte (links) in wie in (A) beschriebenen sortierten primären Zellen analysiert mittels quantitativer Echtzeit-PCR. Nicht-sortierte intestinale Zellen wurden als Referenzprobe (*) verwendet. Die Reinheit der sortierten Zellen wurde durch Analyse der relativen Häufigkeit von EpCAM (mitte) und CD45 (rechts) Transkripten überprüft. Die Daten wurden auf 18S rRNA normiert.

CD45 ist ein Mitglied der Protein Tyrosin Phosphatase (PTP) Familie und wird auf allen hämatopoetischen Zellen außer reifen Erythrozyten und Thrombozyten exprimiert (Suzuki et al., 2000). EpCAM hingegen ist im gesunden Gewebe nur auf der basolateralen Zellmembran von einfachen, pseudo-stratifiziertem und transitionalem Epithel vorzufinden (Schnell, Cirulli, & Giepmans, 2013). Wie in Abbildung 23 B dargestellt, wurden *Clec2e* Transkripte ausschließlich in den EpCAM⁺ Epithelzellen, jedoch nicht in der CD45⁺ Leukozytenpopulation detektiert. Somit zeigen diese Daten eine selektive Expression des *Clec2e* Gens in intestinalen Epithelzellen.

Aufgrund der erfolgreichen Generierung eines Clr-a spezifischen monoklonalen Antikörpers (Klon 2E3) (Abschnitt 2), war es nun möglich endogenes Clr-a in Proteinlysaten von frisch isolierten Epithelzellen aus dem Dünndarm und Colon von C57BL/6 Mäusen nach der elektrophoretischen Auftrennung im Immunoblot zu detektieren (Abbildung 24 A). Mit einer molekularen Masse von etwa 37-40 kDa unter reduzierenden Bedingungen zeigte endogenes glykosyliertes Clr-a die zu erwartende molekulare

Masse. Nach Deglykosylierung der Proteinlysate mit PNGaseF ist Clr-a mit einer molekularen Masse von 25 kDa zu beobachten.

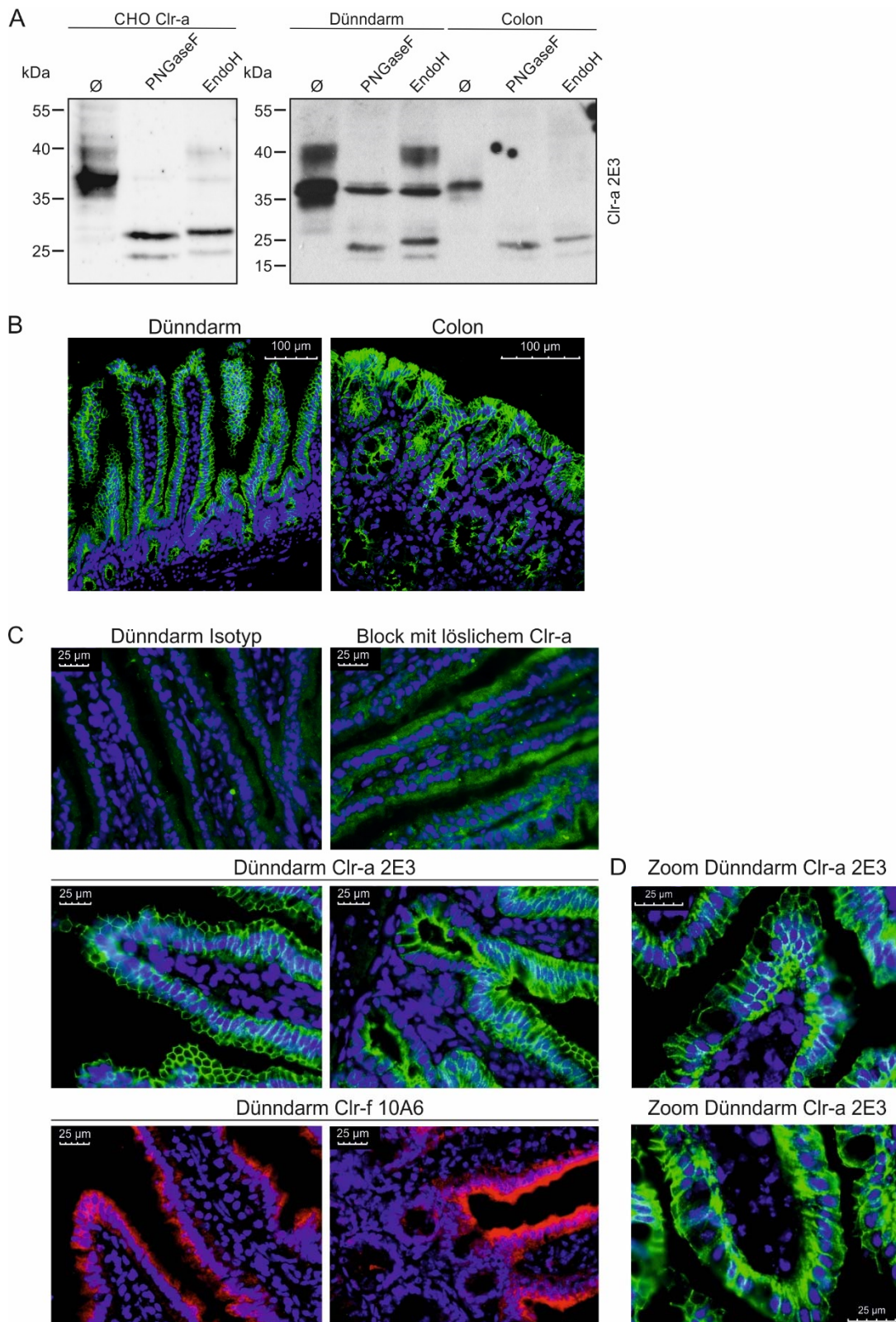


Abbildung 24. Clr-a Expression auf differenzierten Epithelzellen und Kryptzellen im Maudarm. (A) Analyse von Clr-a Glykoproteinen in Zelllysaten des Dünndarms und des Colons im Immunoblot unter Verwendung des Clr-a spezifischen mAk 2E3. Lysate wurden unbehandelt belassen, mit PNGaseF deglykosyliert oder mit EndoH behandelt und unter reduzierenden

Bedingungen mittels SDS-PAGE separiert. Lysate von CHO Zellen, die stabil mit FLAG/6xHis-Tag markierter *Clec2e* cDNA transfiziert wurden, wurden als Kontrolle hinzugezogen. (B) Kryo-Gewebeschnitte (in Längsrichtung) eines Maus Dünndarms (links) und Colons (rechts) wurden auf Clr-a Expression hin untersucht unter Verwendung des anti-Clr-a mAk 2E3 (grün). (C) Expression von Clr-a im Vergleich zu Clr-f auf differenzierten intestinalen Epithelzellen (links, mitte + unten) sowie Kryptzellen (rechts, mitte + unten). Clr-a wurde mit dem spezifischen anti-Clr-a mAk 2E3 (grün) und Clr-f mit dem mAk 10A6 (rot) detektiert. Gezeigt ist ebenfalls die Färbung mit der Isotypkontrolle (grün, oben links) und Färbung von Clr-a nach Blockieren des Clr-a spezifischen mAk 2E3 mit löslichen Clr-a Ektodomänen (grün, oben rechts) zur Kontrolle. (D) Vergrößerte mikroskopische Aufnahme einer Dünndarm Villispitze gefärbt mit dem Clr-a spezifischen mAk 2E3. (B-D) Die nukleäre Gegenfärbung erfolgte mit DAPI.

Diese Ergebnisse stimmen mit der Analyse von Lysaten von 293T und CHO Zellen, die Clr-a ektop exprimierten, überein (siehe Abbildung 17, Abbildung 19). Die Behandlung der intestinalen Lysate mit Endoglykosidase H zeigte reichliche Mengen einer hoch glykosylierten und EndoH resistenten Molekülform. Diese repräsentiert mit großer Wahrscheinlichkeit Clr-a Glykoproteine, die an der Zelloberfläche exprimiert werden. Die Mehrheit der Clr-a Glykoproteine jedoch verbleiben in einem EndoH-sensitiven Zustand. Somit unterliegt Clr-a auch unter physiologischen Bedingungen im Dünndarm und im Colon der intrazellulären Retention. Die in Abbildung 23 B beschriebenen Ergebnisse, die eine selektive Expression des *Clec2e* Gens in intestinalen Epithelzellen zeigte, konnten im Folgenden durch Immunfluoreszenzstudien bekräftigt werden. Die Mikroskopie von gefärbten Dünndarm- und Colon-Gewebeschnitten mit dem Clr-a mAk 2E3 zeigt endogenes Clr-a ausschließlich auf dem Epithelzellsaum und nicht in den darunterliegenden Leukozytenpopulationen (Abbildung 24 B). Das distinkte Färbemuster zeigte auf, dass Clr-a Moleküle sowohl intrazellulär als auch auf der Zelloberfläche sowohl auf der apikalen als auch auf der basolateralen Seite vorliegen (Abbildung 24 E). Interessanterweise konnte Clr-a mithilfe des 2E3 mAk nicht nur auf den differenzierten Epithelzellen entlang der Villi, sondern auch in den intestinalen Stammzellnischen (Krypten) detektiert werden (Abbildung 24 C+D). Dieses Expressionsverhalten ist gegensätzlich zum Clr-f Glykoprotein, welches nur in den differenzierten Epithelzellen vorzufinden ist (Leibelt et al., 2014) (Abbildung 24 D, unten). Des Weiteren wurden Gewebeschnitte verschiedener Bereiche entlang des Gastrointestinaltraktes mittels Immunfluoreszenz untersucht. Im Einklang mit den Daten aus der Echtzeit-PCR (Abbildung 11) war eine einheitliche Clr-a Expression in allen Abschnitten zu beobachten (Abbildung 25).

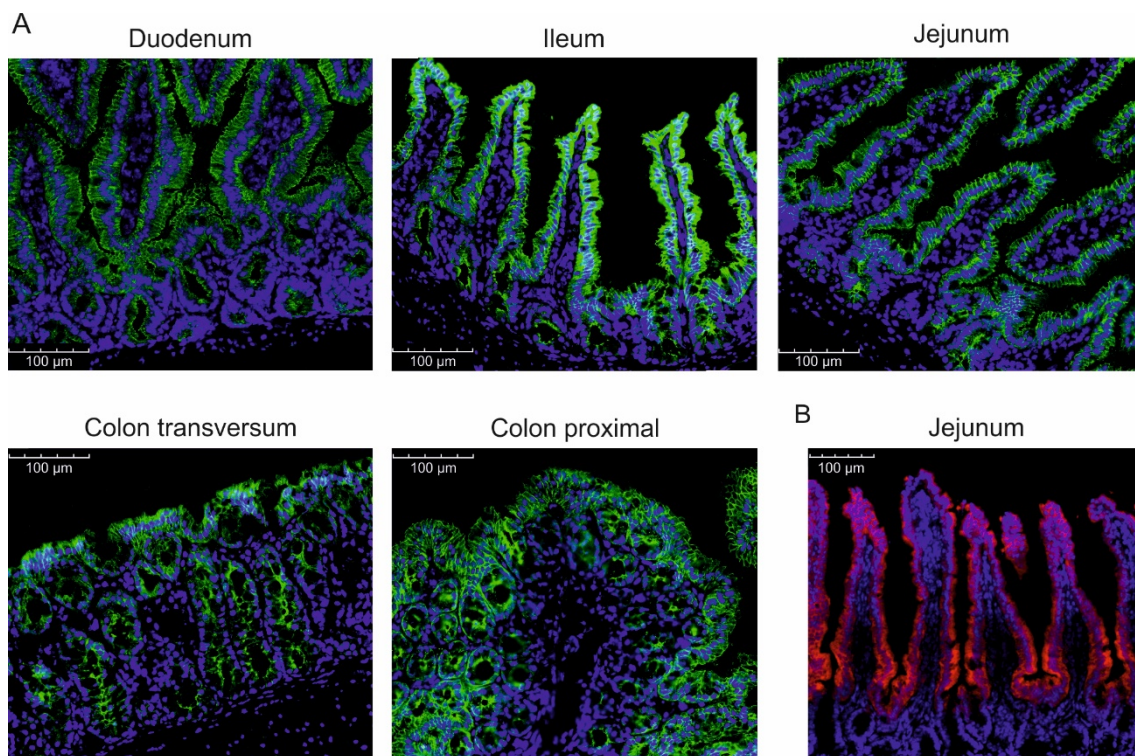


Abbildung 25. Clr-a wird auf intestinale Epithel im gesamten Gastrointestinaltrakt exprimiert. (A) Gefrierschnitte verschiedener Bereiche des Gastrointestinaltraktes wurden auf Clr-a Expression geprüft durch Färbung mit dem Clr-a mAk 2E3 (grün). DAPI wurde für die nukleäre Gegenfärbung verwendet (blau). (B) Clr-f wird ausschließlich auf differenzierten Epithelzellen exprimiert und gegensätzlich zu Clr-a nicht in den Krypten. Detektion erfolgte mit dem spezifischen Clr-f Ak 10A6 (rot). DAPI wurde für die nukleäre Gegenfärbung verwendet (blau).

4.5 Strategien zur Identifikation eines potenziellen Clr-a Rezeptors

Um einen Einblick in die physiologisch funktionelle Relevanz von Clr-a zu erhalten, wurde anschließend die Frage nach einem potenziellen endogenen Bindepartner für das Typ-II Transmembranprotein Clr-a gestellt. Experimentell wurden für die Suche BWN.3G Reporterassays und Fc-Fusionsproteine als gängige Methoden zur Identifikation von Liganden von C-Typ Lektin-ähnlichen Rezeptoren verwendet (Pyž & Brown, 2011).

4.5.1 Detektion eines Clr-a Rezeptors mittels BWN-Reporterassays

Für BWN.3G Reporterstudien wurden durch das Einbringen eines RSV.5 Vektors stabile BWN.3G Reporterzellen generiert, die ein FLAG/His-markiertes Fusionsprotein auf der Zelloberfläche exprimierten. Das Fusionsprotein wurde zusammengesetzt aus einem N-terminalen cytoplasmatischen Anteil der murinen CD3ζ-Kette gefolgt vom Transmembranbereich und der Stalk-Region von Clr-f und der Clr-a CTLD am C-Terminus (Abbildung 26 A). Die Substitutionen der Clr-a Transmembrandomäne und des Stalk-Bereiches durch diejenigen von Clr-f dienten, wie anhand der

Ergebnisse in Abschnitt 3 erzielt, zur Verstärkung der Expression des Fusionsproteins auf der Zelloberfläche (Abbildung 21 A, D, I), was für Interaktionsstudien unabdingbar war. Als Positivkontrolle wurden BWN.3G Reporterzellen gewählt, die das Fusionsprotein CD3ζ-Nkrp1g exprimierten und nach Interaktion mit dessen Liganden Clr-f stimuliert wurden. Die CD3ζ-Kette als Teil des TCR-CD3 Komplexes wird für die Signaltransduktion benötigt. Eine Liganden-vermittelte Konformationsänderung leitet nach Phosphorylierung von Tyrosinen in drei vorhandenen ITAM-Motiven (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) in der Aminosäuresequenz YXX[L/V]X₈₋₁₁YXX[L/V] (X= konservierte AS) die Aktivierung von NFAT (Nuclear Factor of Activated T cell)-Transkriptionsfaktoren ein. Diese binden an NFAT-Transkriptionsfaktorbindestellen innerhalb der eGFP Promoterregion

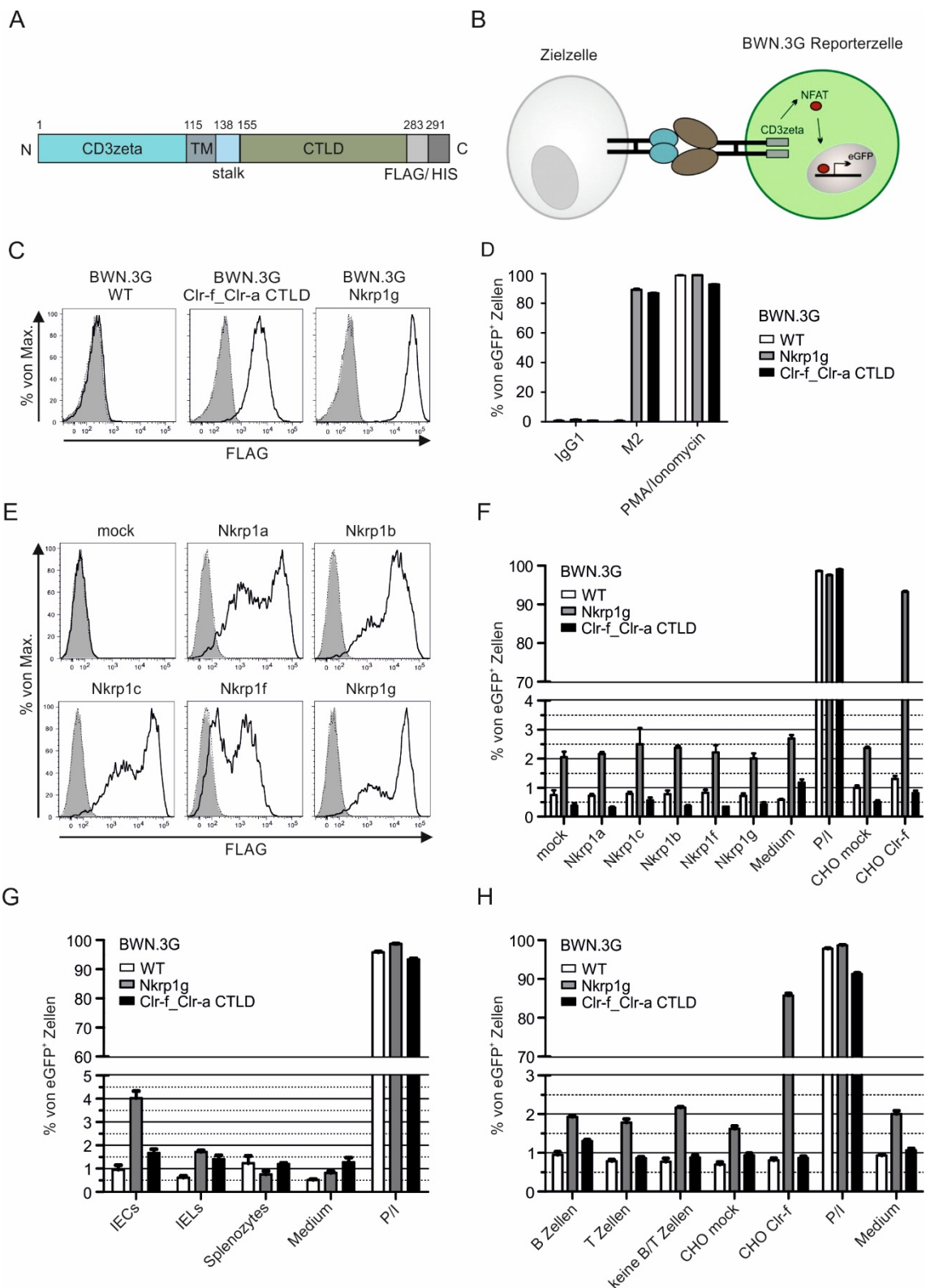


Abbildung 26. BWN-Reporterassays liefern keinen Anhaltspunkt für eine Clr-a Rezeptor tragende Zellpopulation. (A) Schematische Darstellung des FLAG/His-markierten CD3 ζ -Clr-f_Clr-a CTLD Fusionskonstruktes. (B) Graphische Darstellung der Induktion der eGFP Antwort in BWN.3G Reporterzellen nach Ligand-vermittelter Stimulation. (C) Starke Expression der stabilen BWN.3G Reporterzellen der FLAG/His-markierten CD3 ζ -Clr-f_Clr-a CTLD oder CD3 ζ -Nkrp1g Fusionsproteine. Gezeigt sind repräsentative Histogramme nach Färbung mit jeweils einem anti-FLAG M2 Ak (schwarze Linie), der Isotypkontrolle (grau schraffiert) und nur einem sekundärem APC-konjugierten Ziege-anti-Maus Ak (gestrichelte Linie). (D)

Durchflusszytometrisch gemessene Reporterantwort der jeweiligen BWN.3G-Reporterzellen nach Platten-gebundener Ak-Stimulation mit IgG1 als Isotypkontrolle, anti-FLAG M2 oder PMA/Ionomycin. (E) Durchflusszytometrische Analyse von 293T Zellen, die mit unterschiedlicher cDNA von FLAG/His-markierten Nkrp1 Glykoproteinen oder dem Leervektor (mock) als Kontrolle transient transfiziert wurden. Zellen wurden jeweils mit einem anti-FLAG M2 (schwarze Linie), der Isotypkontrolle (grau schraffiert) und nur dem sekundärem Ak (gestrichelte Linie) analysiert. (F-H) BWN.3G Reporterzellen, die entweder CD3 ζ -Clr-f_Clr-a CTLD oder CD3 ζ -Nkrp1g Fusionsproteine (oder parentale BWN.3G zur Kontrolle) exprimieren, wurden kokultiviert mit (F) transient transfizierten 293T Zellen gezeigt unter (E), die unterschiedliche Nkrp1 Rezeptoren besitzen, (G) aus dem Dünndarm frisch isolierten Epithelzellen, IELs sowie Splenozyten aus BALB/c Mäusen oder (H) frisch isolierten B und T Zellen aus der Lamina Propria aus Dünndärmen von BALB/c Mäusen und durchflusszytometrisch auf eGFP Expression untersucht. (D, F-H) Balken repräsentieren den Durchschnittswert der Triplikate mit der jeweiligen Standardabweichung.

und leiten somit die Expression des eGFP-Reportergens ein (Abbildung 26 B). Die eGFP Antwort nach Stimulation wurde in Triplikaten durchflusszytometrisch analysiert. Wie in Abbildung 26 C+D zu erkennen ist, zeigt die Detektion mit einem gegen den FLAG gerichteten Ak, dass die chimären Proteine reichlich an der Zelloberfläche exprimiert wurden und sich Ak-vermittelt stimulieren ließen, was sich in einer eGFP Antwort von etwa 90 % der Zellen äußerte. Die maximale Stimulation der Reporterzellen wurde durch Stimulation mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) und Ionomycin überprüft. Dabei konnte eine eGFP Antwort von 90-100 % erzielt werden. Aufgrund der bekannten genetischen Kopplung von Rezeptor-Liganden Paaren zwischen der Nkrp1 und der CLEC2 Familie innerhalb des Natürlichen Killer-Genkomplexes, kamen zunächst Mitglieder der Nkrp1 Familie als mögliche Clr-a Rezeptoren in Betracht, zudem das *Clec2e* Gen in einer „tail to tail“ Orientierung zu Nkrp1f codiert ist. Für Maus Nkrp1f sind bislang Clr-c, -d und -g als Interaktionspartner beschrieben (Kveberg et al., 2011). Nkrp1f Transkripte sind vor allem in Maus NK Zellen, aber auch dendritischen Vorläuferzellen des Knochenmarks, endothelialen Zellen der Lymphknoten und in APCs vorhanden (Z. Li et al., 2012; W. Tian et al., 2005). Um eine mögliche Interaktion mit Clr-a zu untersuchen, wurden RSV.5 Vektoren mit cDNA der unterschiedlichen FLAG/His-markierten Nkrp1 Rezeptoren transient in 293T Zellen transfiziert und mit den Reporterzellen kultiviert. Die RSV.5 Nkrp1 Vektoren wurden in unserer Arbeitsgruppe von Dr. Stefan Leibelt kloniert. Mit einem anti-FLAG Ak wurde die Expression der Nkrp1 Rezeptoren überprüft. Nkrp1a/-c/-d und -g wurden gleich stark auf der Zelloberfläche exprimiert, eine geringere, jedoch ausreichende Oberflächenexpression wurde bei Nkrp1f beobachtet (Abbildung 26 E). Bis auf die starke Reaktion der Reporterzellen auf die unspezifische Stimulation mit PMA und Ionomycin und auf die Nkrp1-g/Clr-f Interaktion als Positivkontrolle konnten keine Unterschiede in der eGFP Antwort auf die Nkrp1 Rezeptoren im Vergleich zur mock Kontrolle festgestellt werden (Abbildung 26 F). Die selektive Expression von Clr-a auf intestinalen Epithelzellen führte zur Überlegung, einen potenziellen Interaktionspartner auf Zellpopulationen zu identifizieren, die in der Darmumgebung in ständigem Kontakt mit den Epithelzellen stehen. Reporterzellen, die die Clr-a Ektodomäne exprimierten, zeigten

nach der Kokultur mit frisch isolierten Epithelzellen sowie intraepithelialen Lymphozyten als auch Lymphozytenpopulationen der Lamina Propria wie B-Zellen und T-Zellen keine Aktivität der eGFP Reporterzellen (Abbildung 26 G+H). Allerdings reagierten die Nkrp1g Reporterzellen als Positivkontrolle auf eine Stimulation mit den Epithelzellen, die Clr-f auf der Zelloberfläche trugen, nur zu 4 %. Dies sprach entweder dafür, dass dieser Assay nicht sensitiv genug war bei Kokulturen mit Primärmaterial oder aber, dass eine schnelle und starke Abnahme der Clr-f Expression während der Kultivierung bei 37°C über Nacht stattfand. Zudem wurde eine Reihe weiterer Mausgewebe in verschiedenen Reporter zu Stimulator Verhältnissen getestet, die sowohl in unmittelbarer Nähe zum Darm (Peyersche Plaques) als auch weiter entfernt lokalisiert sind (Splenozyten, Thymozyten, Knochenmarkszellen, Zellen aus den Lymphknoten), da der Rezeptor auf migrierenden Lymphozytenpopulationen vorliegen könnte (Daten nicht gezeigt). Neben den Darm- und Mageninhalten wurden auch NK-Zellen nach IL-15 Stimulation auf das Vorhandensein eines Rezeptors untersucht. Die stimulierten NK-Zellen wurden von Miriam Friede zur Verfügung gestellt. Ebenso wurden verschiedene Maus Zelllinien mit den Clr-f_Clr-a CTLD Reporterzellen kokultiviert (Daten nicht gezeigt). Alle durchgeführten BWN-Reporterassays gaben keinen Anhaltspunkt für einen möglichen Clr-a Rezeptor.

4.5.2 Detektion eines Clr-a Rezeptors mittels Clr-a Fc-Fusionsproteinen

4.5.2.1 Produktion von humanen IgG1 Fc-Fusionsproteinen

Anhand der BWN-Reporterassays (Abschnitt 4.5.1) konnte auf verschiedenen Zelllinien und Mausgeweben kein Rezeptor für das Glykoprotein Clr-a gefunden werden. Um diese Ergebnisse mit einem anderweitigen Ansatz zu verifizieren, wurden Clr-a Fc Fusionsprodukte generiert und zur Färbung in der Durchflusszytometrie angewendet. Die Clr-a Ektodomäne (AS 72-216) wurde über einen acht Aminosäure langen flexiblen Glycin-Serin-Linker an den invertierten Fc Teil des humanen IgG1 Immunglobulins fusioniert (Abbildung 27 A). Hierfür wurde die Clr-a Ektodomäne mit dem Linker in

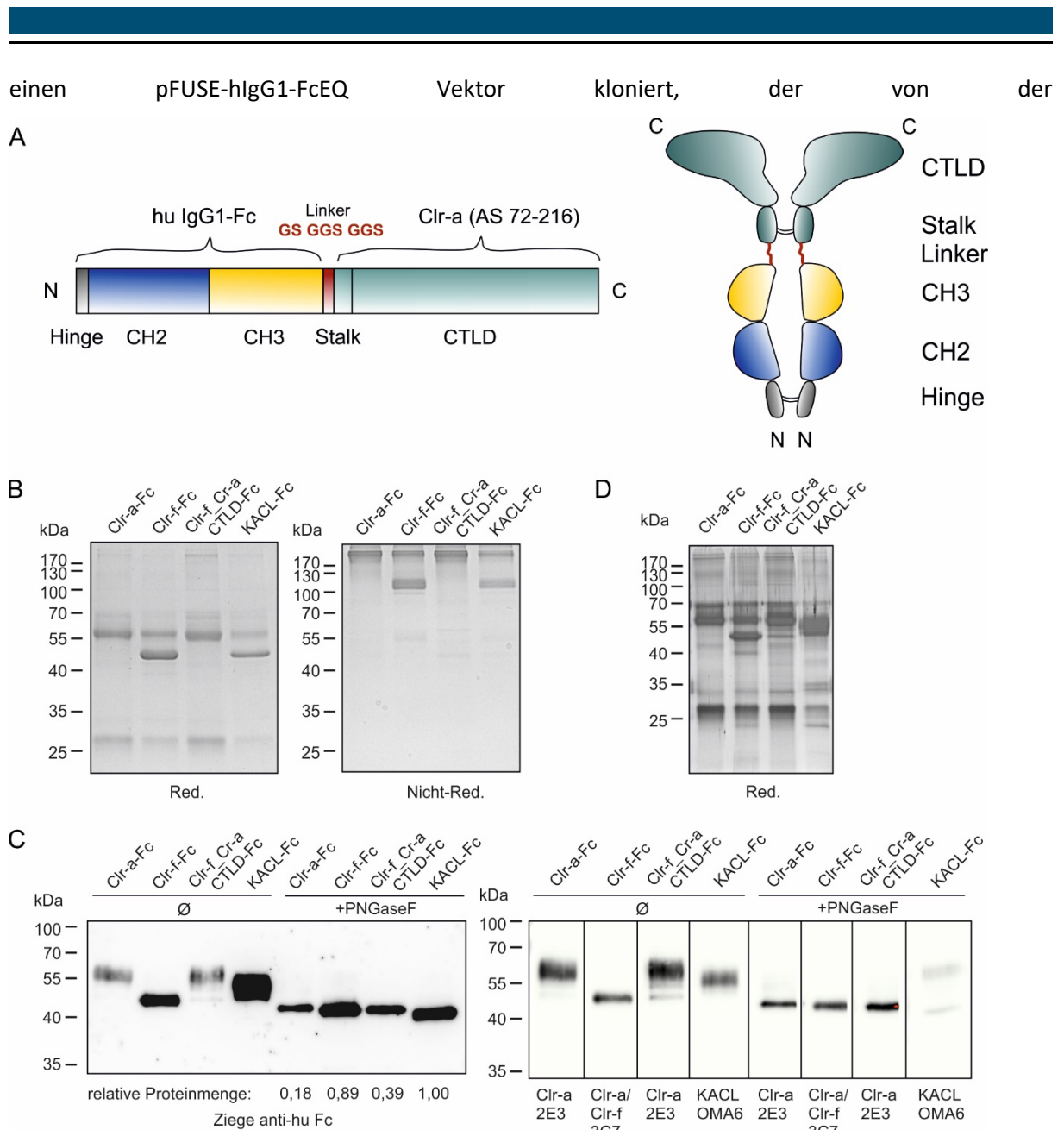


Abbildung 27. Herstellung und Analyse von huIgG1 Fc-Fusionsproteinen. (A) Schematische Darstellung des Clr-a Fc Fusionskonstruktes bestehend aus einem invertiertem humanem IgG1 Fc-Teil verbunden über einen Glycin-Serin(GS)-Linker an die Clr-a Ektodomäne (CTLD). Hu= human, AS=Aminosäuren, CTLD= C-Typ Lektin-ähnliche Domäne, hinge (engl.)=Scharnierregion (B) Graphische Darstellung der monovalenten Fc Fusionsproteine resultierend aus der Expression der unter (A) beschriebenen Konstrukte. Über kovalente Disulfidbrücken innerhalb der Fc Scharnierregion und des Stalk-Bereiches der jeweiligen Proteine werden monovalente Homodimere gebildet. (C) Analyse der produzierten Fc Fusionsproteine Clr-a Fc, Clr-f Fc, Clr-f_Clr-a CTLD Fc und KACL-Fc im Coomassie-Gel nach Auftrennung der aus dem 293T Überstand gereinigten Proteine im SDS-PAGE unter reduzierenden (links) und nicht-reduzierenden (rechts) Bedingungen. (D) Silbergel zur Überprüfung der Fc Fusionsproteine auf Kontamination oder Proteindegradation. Proteine wurden reduziert und über SDS-PAGE elektrophoretisch getrennt. (E) Untersuchung der glykosylierten Fc Fusionsproteine Clr-a Fc, Clr-f Fc, Clr-f_Clr-a CTLD Fc und KACL-Fc im Immunoblot nach elektrophoretischer Auftrennung mittels SDS-PAGE. Die Detektion erfolgte zum einen gegen den huIgG1 Fc-Teil mit einem Ziege-anti-Human Fc-HRP Ak (links) und zum anderen gegen die jeweilige über den Linker gekoppelte Protein Ektodomäne mit den spezifischen Ak anti-Clr-a 2E3, anti-Clr-a/Clr-f 3C7 oder anti-KACL OMA6

gerichtet gefolgt von einem HRP-konjugiertem Ziege-anti-Maus Ak (Clr-a, Clr-f) oder einem Ziege-anti-Human Ak (KACL) (rechts).

Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Joachim Koch (GSH) zur Verfügung gestellt wurde. Dieser enthielt bereits den humanen IgG1 Fc Teil sowie eine IL2-Sekretionssequenz, die eine Sekretion der Fc Fusionsproteine ins Zellkulturmedium ermöglichte. Um eine ungewünschte mögliche Bindungsaktivität an den Fcγ Rezeptor (FcγR) auf Zielzellen über die Immunglobulin Domäne zu reduzieren, wurde in der Arbeitsgruppe Koch Leucin an AS-Position 118 zu Glutamat mutiert und eine Glykosylierungsakzeptorstelle an AS-Position 180 entfernt (FcEQ) (Hartmann et al., 2012). Als Kontrollproteine wurden Maus Clr-f Fc, welches an den bekannten Rezeptor Nkrp1g bindet, und das humane KACL Fc hergestellt, von dem keine Bindung an murine Gewebe oder Zellen zu erwarten ist. Zudem wurde neben der reinen Clr-a Ektodomäne eine Variante gewählt, bei der die Stalk-Region durch diejenige von Clr-f substituiert wurde (Clr-f_Clr-a CTLD). Mit dieser zusätzlichen Variante könnte bei einer möglichen Interaktion von Clr-a geklärt werden, ob der Stalk-Bereich auf die Bindung einen Einfluss hat. Die pFUSE-hIgG1-FcEQ-Clr und -KACL Konstrukte wurden transient in 293T Zellen eingebracht und die sezernierten Fc Fusionsproteine nach Produktion aus dem Kulturüberstand mittels Affinitätschromatografie über eine Protein A Säule gereinigt. Die Proteinkonzentrationen wurden jeweils photometrisch ermittelt. Nach elektrophoretischer Auftrennung mittels SDS-PAGE wurden die Fc Fusionsproteine im Coomassie-Gel, im Silbergel sowie im Immunoblot auf Reinheit und Proteinzusammensetzung untersucht (Abbildung 27 B-D). Wie darauf zu erkennen ist, hatten die Fc Fusionsproteine die zu erwartende molekulare Größe zwischen 45 kDa und 58 kDa in reduzierter Form. Das Fc Fusionsprotein Clr-a setzte sich mit einer größeren molekularen Masse von 58 kDa eindeutig von Clr-f mit einer molekularen Masse von 46 kDa ab, was den Unterschied des Glykosylierungszustandes der Ektodomäne, widerspiegelte. Zusätzliche Banden unter reduzierenden Bedingungen knapp über 25 kDa bei allen Fc Fusionsproteinen sowie bei 55 kDa bei Clr-f Fc und KACL Fc waren sehr wahrscheinlich Verunreinigungen aus dem Zellkulturüberstand, z. B. Rinderimmunglobuline. Unter nicht reduzierten Bedingungen besaßen KACL Fc und Clr-f Fc die doppelte molekulare Masse, was für eine korrekte Ausbildung eines Homodimers verknüpft über kovalente Disulfidbrücken sprach (Abbildung 27 A+B rechts).

Aus dem Immunoblot in Abbildung 27C ist auch zu ersehen, dass nach PNGaseF Verdau die molekulare Masse aller Fc Fusionsproteine von knapp 46-58 kDa auf eine molekulare Masse von knapp über 40 kDa reduziert worden. Somit lagen die Fc Fusionsproteine in glykosylierter Form vor. Die Detektion erfolgte entweder gegen den Fc-Teil gerichtet mit einem Ziegen-anti-human Fc Ak (Abbildung 27 C links) oder mit einem gegen das jeweilige Protein spezifischen Ak (anti-Clr-a 2E3, anti-Clr-a/Clr-f 3C7 und anti-KACL OMA6) (Abbildung 27 C rechts). Die Detektion mit beiden Antikörpern zeigte das gleiche

Bandenmuster. Somit wurde erfolgreich nachgewiesen, dass alle Fc Fusionsproteine glykosyliert vorlagen und sowohl eine Immunglobulin Domäne als auch eine Protein Ektodomäne besaßen.

Um die photometrisch bestimmten Proteinkonzentrationen zu bestätigen, wurde im Immunoblot die Bandenintensität der Fc Fusionsproteine nach PNGaseF Verdau mithilfe des Programms Fusion ermittelt und der jeweilige Proteinanteil im Verhältnis zu KACL Fc errechnet (siehe Abbildung 27 C). Zur Färbung in der Durchflusszytometrie wurde somit die 5-fache Menge an Clr-a Fc und die doppelte Menge an Clr-f_Clr-a CTLD Fc eingesetzt.

4.5.2.2 Funktionalität der humanen IgG1 Fc-Fusionsproteine

Um die Funktionalität und Spezifität der Fc Fusionsproteine zu untersuchen, wurden Nkrp1g exprimierende oder parentale BWN.3G Reporterzellen mit dem Clr-f Fc Protein und NKp65 oder Leervektor (mock) tragende NK-92MI mit dem KACL Fc detektiert. Die Ergebnisse in Abbildung 28 zeigen die Interaktion der Fc Fusionsproteine mit ihren Bindepartnern. Die Nkrp1g, Nkrp1f, NKp65 und NKp80 Expression der stabilen Zelllinien wurde entsprechend mit einem anti-FLAG Ak (bei Nkrp1g und Nkrp1f) oder einem anti-NKp65 Ak (7G5) und anti-NKp80 Ak (5D12) überprüft. Die Färbung beider Fc Fusionsproteine war spezifisch, da KACL Fc keine Färbung auf den NKp65 negativen BWN Zellen und Clr-f Fc keine Färbung auf den humanen NK-92MI aufzeigte. Neben dem ektop stark exprimierten NKp65 band KACL Fc zudem das endogene auf der Zelloberfläche schwach vorliegende NKp65 Molekül in den NK-92MI Zellen. Auffällig war jedoch die schwächere aber deutliche Färbung mit dem Clr-f Fc auch auf den parentalen oder Nkrp1f positiven BWN Zellen. Dies führte zu der Annahme, dass entweder etwas auf den BWN Zellen unspezifisch detektiert wurde oder aber, dass hier ein noch unbekannter Clr-f Rezeptor gebunden wurde. Um Kontaminationen, die möglicherweise zu einer Kreuzvernetzung und unspezifischer Reaktion der Fc Fusionsproteine führen könnten, zu erkennen, wurden alle Fc Fusionsproteine im SDS-Gel nach Auftrennung mittels SDS-Gelelektrophorese und anschließender Coomassie Färbung (Abbildung 27 B) sowie nach der sensitiveren Färbung mit Silber untersucht (Abbildung 27D). Die Clr-f Fc Proteinlösung enthielt keine auffälligen starken Proteinbanden, die nicht ebenso bei KACL Fc beobachtet wurden und zu einer unspezifischen

Interaktion führen könnten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde nicht weiter darauf eingegangen.

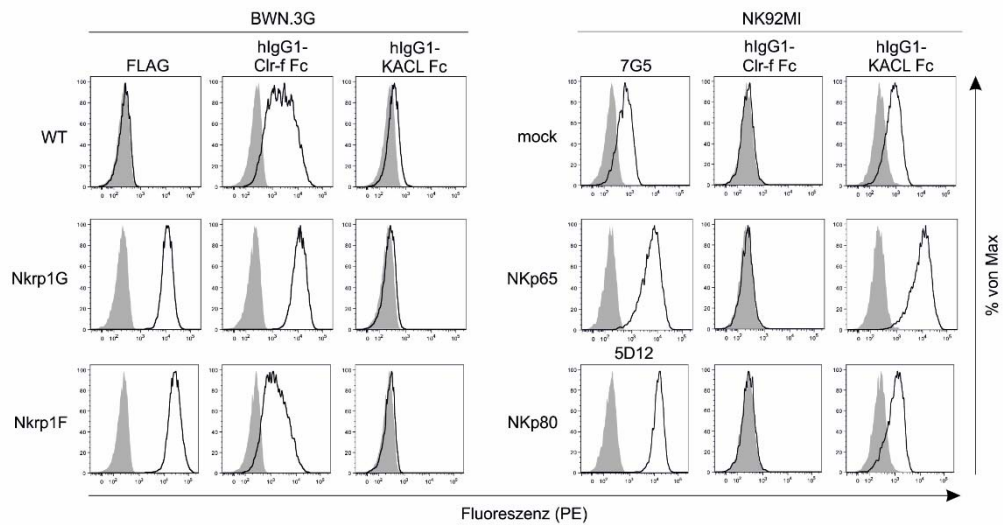
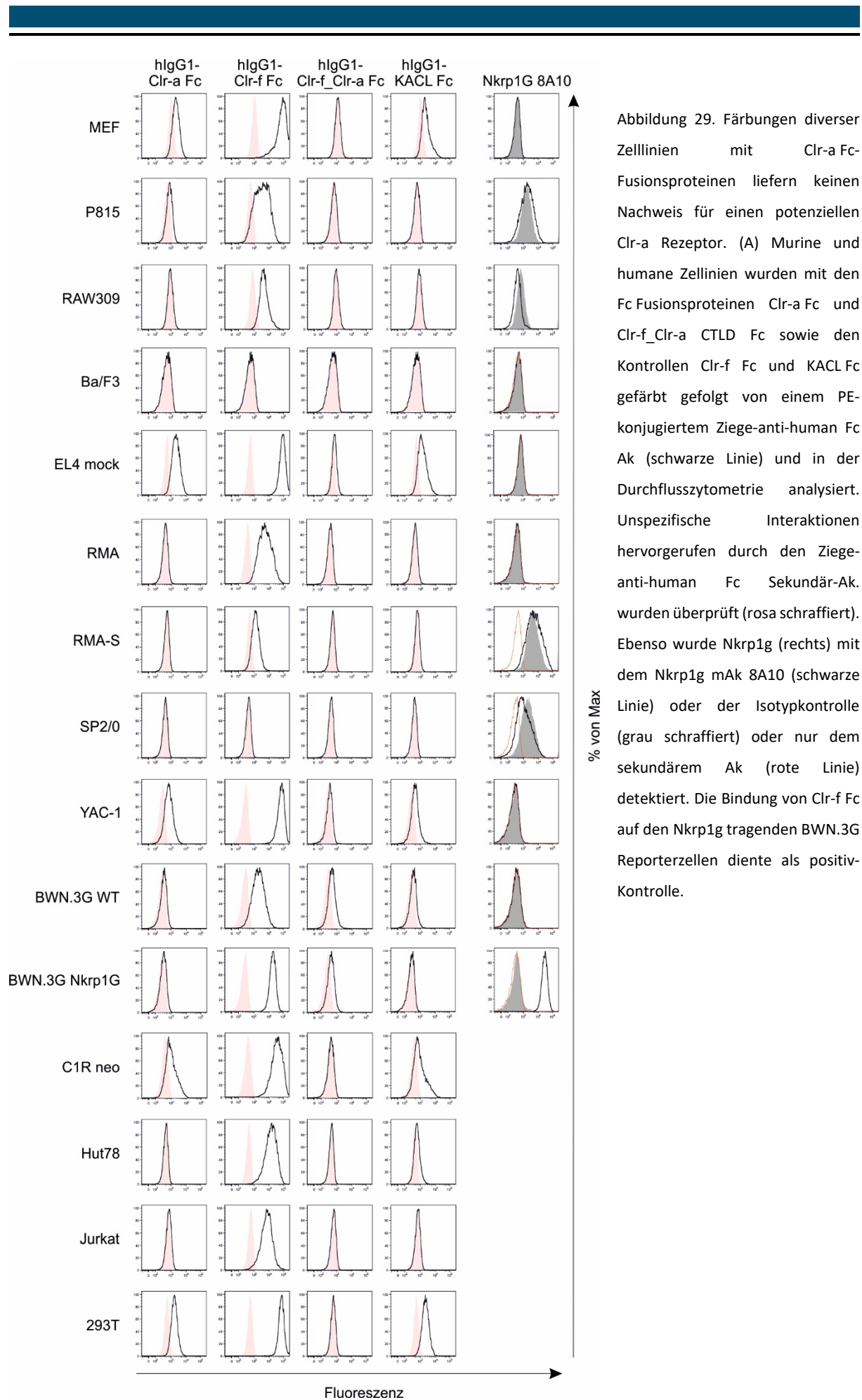


Abbildung 28. Bindung der hulgG1 Fc-Fusionsproteine Clr-f Fc und KACL Fc an den jeweiligen bekannten Rezeptor Nkrp1g oder NKp65. (A) Durchflusszytometrische Analyse zur funktionellen Interaktion des Clr-f Fc Fusionsproteins mit Nkrp1g tragenden BWN.3G Reporterzellen sowie parentalen BWN.3G WT und BWN.3G Nkrp1f zur Kontrolle (mitte; schwarze Linie). Als Kontrollfärbung diente nur der sekundäre PE-konjugierte Ziege-anti-humanes Fc Ak (mitte; grau schraffiert). Die Proteinexpression wurde mit dem anti-FLAG M2 Ak (links; schwarze Linie) und der Isotypkontrolle (links; grau schraffiert) überprüft. Als negativ Kontrolle wurde Detektion mit dem KACL Fc gewählt. (B) Durchflusszytometrische Analyse zur funktionellen Interaktion von KACL Fc mit NKp65 oder den Leervektor (mock) tragenden NK-92MI sowie NK-92MI NKp80 als Kontrolle (rechts; schwarze Linie). Zur Kontrollfärbung diente nur der sekundäre PE-konjugierte Ziege-anti-humanes Fc Ak (rechts; grau schraffiert). Die Proteinexpression wurde mit einem anti-NKp65 mAk 7G5 oder einem anti-NKp80 mAk 5D12 (links; schwarze Linie) und der jeweiligen Isotypkontrolle (links; grau schraffiert) überprüft. Als negativ Kontrolle wurden die Zellen mit dem Clr-f Fc gefolgt von einem PE-konjugierte Ziege-anti-humanes Fc Ak gefärbt (mitte).

4.5.2.3 Interaktionsstudie auf Zelllinien

Zur Detektion eines Clr-a Rezeptors, wurden nach erfolgreicher Produktion der Fc Fusionsproteine vier humane und elf Mauszelllinien mit allen Fc Fusionsproteinen gefärbt und in der Durchflusszytometrie analysiert (Abbildung 29). Weder Clr-a Fc noch Clr-f _Clr-a CTLD Fc zeigten eine eindeutige, spezifische Färbung und lieferten somit in Übereinstimmung mit BWN-Reporterassays unter Verwendung von Zelllinien (Daten nicht gezeigt) keinen Nachweis für einen Clr-a Rezeptor. Leichte Färbungen von YAC1, EL4 mock, MEF, C1Rneo und 293T waren neben Clr-a Fc ebenfalls mit der Negativkontrolle KACL Fc zu beobachten und somit wahrscheinlich unspezifisch.

Interessanterweise waren auf allen Zelllinien bis auf Ba/F3 sowie auf den BWN Reporterzellen unterschiedlich starke Färbungen mit Clr-f Fc ersichtlich trotz der

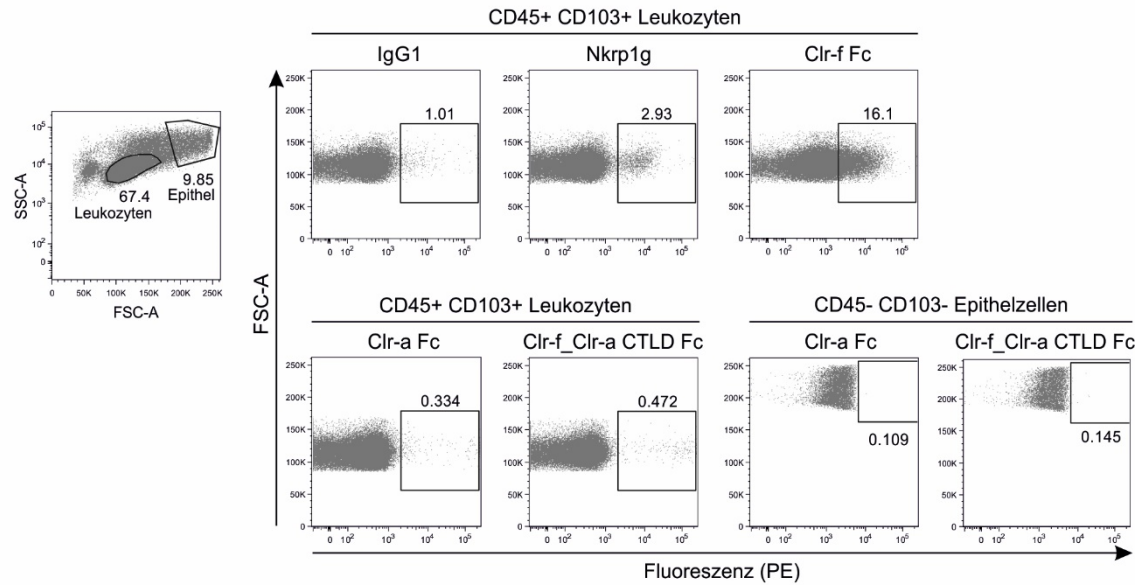


nicht vorhandenen Nkrp1g Expression (Abbildung 29). Um die Frage nach einem potenziellen neuen Clr-f Rezeptor zu klären, wurden die Zellen zudem mit Clr-f Tetrameren gefärbt und untersucht (Daten nicht gezeigt). Aufgrund eines je nach Zelllinie teilweise gegensätzlichen Färbeverhaltens der Clr-f Tetramere im Vergleich zu den Fc Fusionsproteinen, wurde die Fragestellung im Rahmen dieser Arbeit nicht weiterverfolgt.

4.5.2.4 Interaktionsstudie mit murinen intestinalen Primärzellen

Aufgrund der Darm-spezifischen Expression von Clr-a wurde eine mögliche Bindung der Fc Fusionsproteine ebenso auf Maus Dünndarm Epithelzellen und IELs getestet (Abbildung 30). Die Clr-a Herunterregulierung unter inflammatorischen Bedingungen (Abschnitt 7) könnte wie umgekehrt für den Clr-f Rezeptor Nkrp1g publiziert (Leibelt et al., 2014) eine Heraufregulierung eines potenziellen Rezeptors induzieren. In Abbildung 30 sind die Färbungen mit den Fc Fusionsproteinen auf Epithelzellen (CD45.2⁻ CD103⁻-Population) und IELs (CD45.2⁺ CD103⁺-Population) von PBS im Vergleich zu Poly(I:C) behandelten BALB/c Mäusen dargestellt. Wie bereits von Dr. Stefan Leibelt publiziert, nahm die Nkrp1g Expression in den Poly(I:C) behandelten Mäusen ab. Dies war auch anhand der Färbung mit den Clr-f Fc Fusionsproteinen und den anti-Nkrp1g Antikörpern ersichtlich. Anhand der Färbungen konnte mit den Clr-a und den Clr-f_Clr-a Fc Fusionsproteinen wiederum auf keinen möglichen Clr-a Rezeptor geschlossen werden.

A Stimulation mit PBS



B Stimulation mit Poly(I:C)

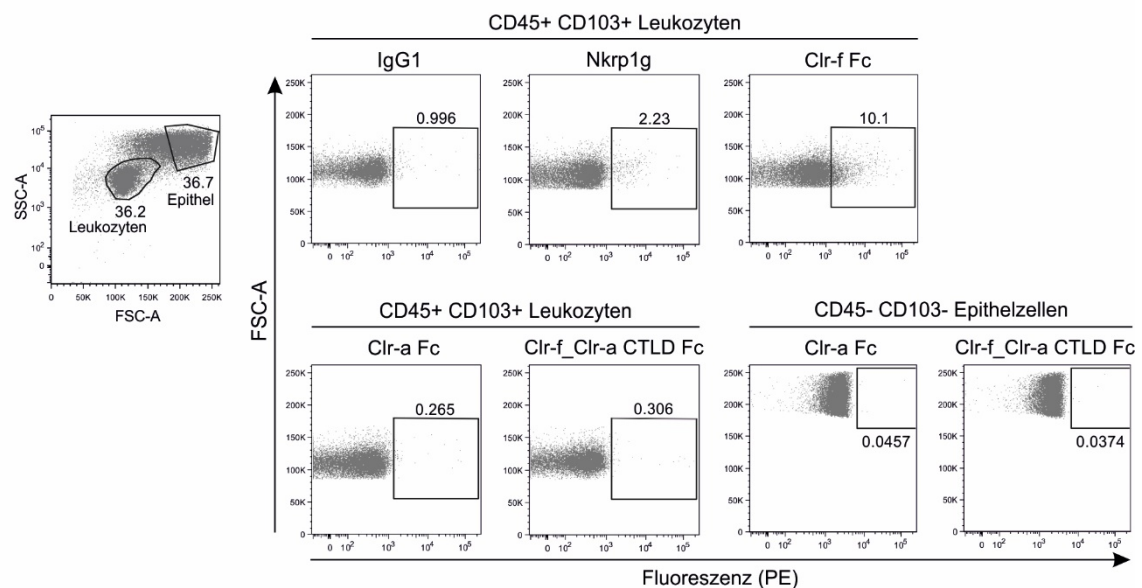


Abbildung 30. Färbung von Balb/C Dünndarmzellen mit Clr-a Fc Fusionsproteinen liefert keinen Nachweis für einen Clr-a Rezeptor. Durchflusszytometrische Analyse von Dünndarmzellen von mit PBS (A) oder mit 30 µg/g Körpergewicht Poly(I:C) (B) behandelten Balb/C Mäusen. Die Epithelzell- und Leukozyten (IEL)-Population wurde anhand der Marker CD45.2 und CD103 getrennt. Die Färbung mit den Clr-a/Clr-f Fc Fusionsproteinen wurde sekundär mit einem PE-konjugierten Ziegen-anti-human Fc Ak detektiert. Zur Kontrolle diente die Färbung mit einem anti-Nkrp1g Ak gegen den Isotyp (IgG1) sowie den Clr-f Fc Fusionsproteinen.

4.6 Mögliche Heterodimerbildung zwischen Clr-a und Clr-f

Da die BWN.3G-Reporterassays und Färbungen mit den Fc-Fusionsproteinen keinen Beweis lieferten für die Existenz eines Rezeptors für Clr-a, wurde die Hypothese einer potenziellen Clr-a/Clr-f

Heterodimerisierung untersucht. Über eine Heterodimerbildung innerhalb der Maus Clr Familie wurde bereits zwischen Clr-b und anderen Clr Molekülen spekuliert (Iizuka et al., 2003, Carlyle et al., 2015).

4.6.1 Einfluß von Clr-a auf die funktionelle Nkrp1g – Clr-f Interaktion

Die selektive und parallele Expression der strukturverwandten Glykoproteine Clr-a und Clr-f in intestinalen Epithelzellen lieferte die Idee, dass Clr-a nicht nur als Homodimer sondern auch im Komplex mit Clr-f auf der Zelloberfläche vorzufinden sein könnte. Es ist möglich, dass Clr-a unter Ausbildung eines Heterodimers die Funktion von Clr-f modifizieren und somit einen Einfluß auf die funktionelle Bindung zwischen Clr-f und dessen inhibierenden Rezeptor Nkrp1g haben könnte. Um eine potenzielle Funktionsregulation zu adressieren, wurden mit unterschiedlichen Fluorochromen markierte Clr-a und Clr-f cDNA in CMV-getriebenen pIRES2-Vektoren zusammen transient in 293T Zellen eingebracht und gegen Nkrp1g exprimierende BWN.3G Reporterzellen (siehe Abschnitt 5.1) getestet. Um zu überprüfen, ob die Clr-f-Nkrp1g Bindung durch die Ko-Transfektion per se nicht modifiziert wird, wurde Clr-f mit dem Leervektor oder dem humanen C-Typ Lektin-ähnlichem Protein KACL ko-transfiziert. Die Unterscheidung zwischen den nicht transfizierten, den einfach und den doppelt positiven Zellpopulationen erfolgte Fluorochrom-basierend im Durchflusszytometer, da Clr-f vom bicistronischen pIRES2 eGFP Vektor (siehe Abschnitt 2) und Clr-a vom pIRES2 dsRED Vektor transkribiert wurde. Hierfür wurde die Clr-a kodierende cDNA aus dem pIRES2 eGFP Vektor (siehe Abschnitt 3) in einen pIRES2 dsRED Vektor inseriert. Zudem wurden bei beiden Clr Sequenzen die carboxyterminal vorhandenen FLAG-Tags deletiert, um eine durch den Tag bedingte mögliche unspezifische Funktionsinterferenz zu vermeiden. Für den Reporterassay wurden sortierte und somit reine Zellpopulationen eingesetzt (Abbildung 31 A). Die Proteinexpression wurde mit den jeweils spezifischen mAk untersucht. Die Detektion von Clr-f mit dem mAk 10A6 zeigt eine starke Präsenz auf der Oberfläche. Das Einbringen eines zusätzlichen Proteins verringerte die ektope Clr-f Expression.

Die Analyse der Stimulation der BWN.3G Reporterzellen erfolgte durchflusszytometrisch durch Messung der eGFP Expression. Dabei konnten die murinen Reporterzellen eindeutig von den humanen 293T unterschieden werden durch Markierung der MHC Klasse I Moleküle. Clr-f alleine führte zu einer starken Reporterantwort mit einem eGFP positiven Zellanteil von nahezu 90 % (Abbildung 31 B). Die Ko-Expression des Leervektors zeigte keine Veränderung der Reporterantwort, ebenso wie die Überexpression von Clr-a. Anhand dieses Assays war somit zu beobachten, dass die ektope Ko-Expression von Clr-a und Clr-f in 293T Zellen keinen Einfluss auf die funktionelle Interaktion zwischen Clr-f und Nkrp1g hatte.

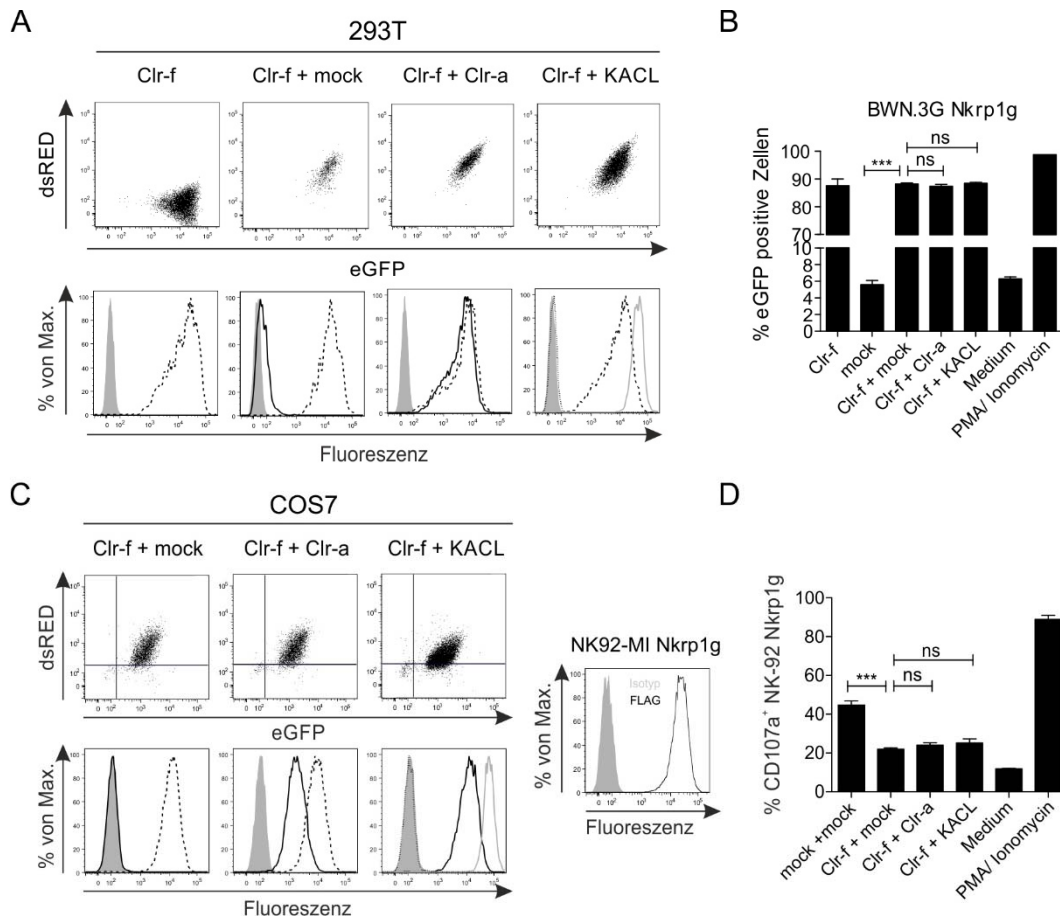


Abbildung 31. Funktionelle Interaktion von Clr-f mit dessen inhibierenden Rezeptor Nkrp1g wird nicht beeinflusst durch Clr-a Ko-Expression. (A+B) Reporterassay zwischen CD3 ζ Nkrp1g Hybridrezeptor exprimierenden BWN.3G Reporterzellen in Kokultur mit Clr-a/Clr-f ko-exprimierenden 293T Zellen. (A) Durchflusszytometrie von 293T Zellen, die transient transfiziert wurden mit Tag-loser Clr-a (dsRED) und/oder Clr-f (eGFP) cDNA nach Sortierung von ko-transfizierten dsRED und eGFP positiven (Clr-f nur eGFP) Zellpopulationen (obere Reihe). Ko-Transfektionen mit dem Leervektor (mock) oder KACL diente als Kontrolle. Die Oberflächenexpression der Clr sowie KACL Moleküle der sortierten 293T Zellen (untere Reihe) wurde durch Färbung mit dem Clr-a spezifischen mAk 2E3 (schwarze Linie), dem Clr-f mAk 10A6 (gestrichelte Linie) und dem anti-KACL mAk OMA6 (graue Linie) gezeigt. (B) Clr-a Ko-expression beeinträchtigt nicht die funktionelle Erkennung von Clr-f durch Nkrp1g-Hybridrezeptor tragende BWN.3G Reporterzellen. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der eGFP positiven BWN.3G-Nkrp1g Reporterzellen als Antwort auf die Ko-kultur mit 293T Transfektanten. Zur statistischen Auswertung wurde ein Einweg ANOVA mit Dunnett posttest verwendet. (C+D) Degranulation von NK-92MI-Nkrp1g Zellen nach Ko-kultur mit Clr-a/Clr-f exprimierenden COS7 Zellen. (C) Durchflusszytometrische Analyse von COS7 Zellen transient ko-transfiziert mit Tag-loser Clr-f (eGFP) und Clr-a bzw. KACL cDNA oder Leervektor (alle dsRED) als Kontrolle nach Sortierung von dsRED/eGFP positiven Zellen (obere Reihe). Die Oberflächenexpression wurde wie unter (A) beschrieben mit spezifischen mAk analysiert. (D) Clr-a Ko-expression zeigt keinen Einfluss auf die Inhibition der NK-92MI Degranulation, die mit der Clr-f-Nkrp1g Interaktion einhergeht. Zur statistischen Auswertung wurde ein Einweg ANOVA mit Tukey posttest verwendet. (A-D) Gezeigt ist ein repräsentatives von zwei unabhängigen Experimenten.

In einem weiteren Versuchsansatz wurde untersucht, ob die Ko-expression von Clr-a in transient transfizierten COS7 Clr-f Zellen einen Einfluß auf die inhibierende Funktion des Nkrp1g Rezeptors in

NK-92MI Zellen hat. Hierfür wurden COS7 Zellen wie für 293T beschrieben transient transfiziert und sortiert. In Abbildung 31 C wird eine starke Oberflächenexpression von Clr-f deutlich, die im Unterschied zu den 293T Zellen nach Überexpression von Clr-a nur marginal schwächer wird. Im Degranulationsassay wurden die gesorteten COS7 Zellen mit stabil transfizierten Nkrp1g tragenden NK-92MI Zellen ko-kultiviert unter Zugabe eines CD107a (LAMP-1) Ak. Als NK-Zell Aktivitätsmarker wird CD107a nach Exocytose der cytotoxischen Granula und somit nach Degranulation der NK-92MI Zellen auf der Zelloberfläche präsentiert und detektiert. Die NK-92MI Zellen wurden mit einem Ak gegen den humanen NK-Zell Marker CD56 markiert und durchflusszytometrisch auf CD107a Expression hin untersucht. Aufgrund der Expression von Liganden auf den COS7 Zellen für aktivierende Rezeptoren auf den NK-92MI führte bereits die mit dem Leervektor transfizierte Kontrollpopulation „mock+mock“ zur Degranulation von 46 % der Nkrp1g tragenden NK-92MI Zellen (Abbildung 31 D). Wie erwartet degranulieren nach Interaktion mit Clr-f exprimierenden COS7 mit etwa 20 % deutlich weniger NK-Zellen. Gleichzeitige Expression des Clr-a Glykoproteins resultierte in einer geringen und nicht signifikanten Zunahme der NK-92MI Degranulation. Neben der unveränderten Bindungskapazität zwischen Clr-f und Nkrp1g in den BWN Reporterassays hatte die Ko-expression von Clr-a ebenso keine Wirkung auf die Inhibition der NK-Zell Funktion von Clr-f nach Bindung an Nkrp1g auf den NK-92MI Zellen.

4.6.2 Clr-a/Clr-f Heterodimere als mögliche Liganden für Nkrp1-Rezeptoren

Da innerhalb der Interaktionsstudien von Clr-a bislang kein Rezeptor identifiziert werden konnte (Abschnitt 4.5), wurde die Idee eines Clr-a/Clr-f Heterodimer-Komplexes als zusammengesetzter Ligand für eine potenzielle Interaktion mit Nkrp1 Rezeptoren in Betracht gezogen. Die Nkrp1 Rezeptoren wurden auf Bindung in BWN.3G Reporterassays durchflusszytometrisch auf eGFP Expression hin untersucht. Da in unserer Arbeitsgruppe nur die BWN.3G Nkrp1f und BWN.3G Nkrp1g Reporter vorhanden waren, wurden zunächst die fehlenden Reporter Nkrp1a, Nkrp1c und Nkrp1d durch Transduktion von BWN.3G WT Zellen generiert. Hierfür wurden FLAG Tag versehene Fusionskonstrukte kloniert, die den cytoplasmatischen Anteil der murinen CD3ζ-Kette gefolgt von einem Transmembranabschnitt des murinen Proteins Ly49a und den jeweiligen stalk-Abschnitt sowie die CTLD der Proteine Nkrp1a, Nkrp1c oder Nkrp1d umfassten (Abbildung 32 A). Diese Konstrukte wurden in einem pMXs-IP-Vektor stabil in BWN.3G Reporterzellen eingebracht. Die Hybridrezeptoren wurden reichlich auf der Oberfläche von BWN.3G präsentiert und ließen sich Antikörper-vermittelt mit einem anti-FLAG M2 mAk stimulieren, sodass ein hoher Anteil einer eGFP⁺-Zellpopulation detektiert werden konnte (Abbildung 32 B+C). Ko-Kulturen von Nkrp1-Hybridrezeptor tragenden Reporterzellen mit sortierten Clr-a und Clr-f Ko-exprimierenden 293T Zellen zeigten im Vergleich zu den

Negativkontrollzellen „Clr-a und mock“ sowie „Clr-a und KACL“ keine signifikanten Änderungen der eGFP Reporterantwort (Abbildung 32 D+E). Somit kann anhand dieser Daten ein möglicher Clr-a/Clr-f Heterodimer-Komplex als Ligand für Nkrp1 Rezeptoren ausgeschlossen werden.

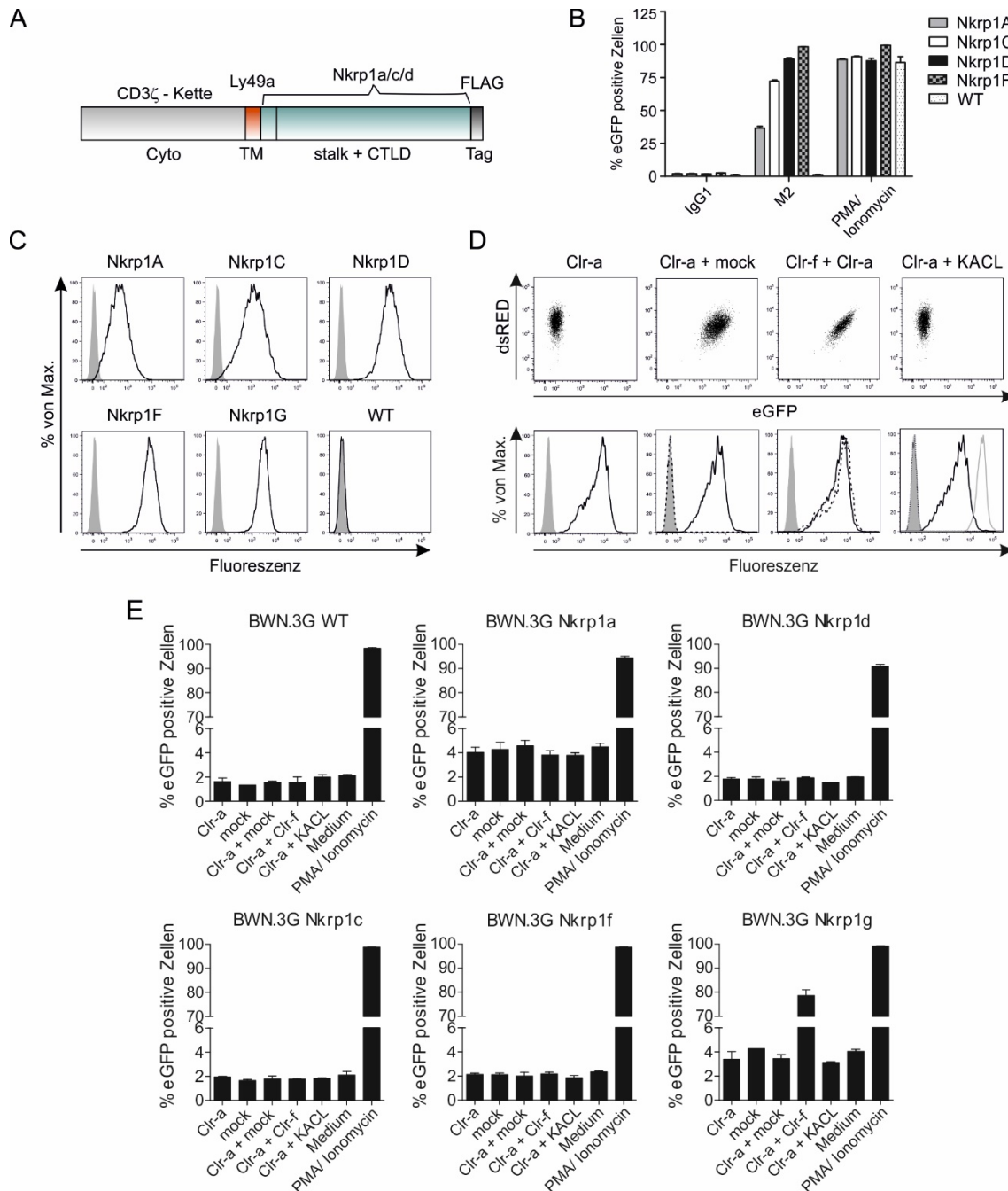


Abbildung 32. Clr-a/Clr-f Heterodimerkomplex fungiert nicht als potenzieller Interaktionspartner in trans für Rezeptoren der Nkrp1 Familie. (A) Schematische Darstellung der Nkrp1-cDNA Fusionskonstrukte im pMX-siP Vektor, der zur Generierung stabiler BWN.3G Nkrp1 Reporterzellen genutzt wurde. Diese bestehen N-terminal aus dem cytoplasmatischen Teil der murinen CD3 ζ -Kette fusioniert an den Transmembranbereich des murinen Proteins Ly49a. Im Anschluss folgt der extrazelluläre Teil der Nkrp1-Rezeptoren, jeweils der stalk-Bereich und die CTLD von Nkrp1a/c oder -d. Zur Analyse der Oberflächenexpression wurden die Konstrukte mit einem FLAG-Tag versehen. (B) Anteil der eGFP positiven Zellpopulation nach Stimulation mit einem auf einer Platte immobilisiertem anti-FLAG M2 mAk sowie der Isotypkontrolle IgG1. Zur

Ermittlung der maximalen Nkrp1-Reporterantwort wurden die Zellen mit PMA und Ionomycin behandelt. (C-E) Reporterassay zwischen CD3 ζ -Nkrp1 Hybridrezeptor exprimierenden BWN.3G Reporterzellen in Kokultur mit Clr-a/Clr-f ko-exprimierenden 293T Zellen. (C) Starke Expression der CD3 ζ -Nkrp1 Hybridrezeptoren auf der Oberfläche von BWN.3G Reporterzellen detektiert mit einem anti-FLAG mAk gefolgt von einem APC-konjugiertem Ziege-anti-Maus Ak in der Durchflusszytometrie. (D) Durchflusszytometrische Analyse von transient transfizierten 293T Zellen mit Tag-loser Clr-a (dsRED) und/oder Clr-f (eGFP) cDNA nach Sortierung von dsRED/eGFP positiven 293T (obere Reihe). Die Clr Oberflächenexpression wurde mit dem spezifischen Clr-a mAk 2E3 (schwarze Linie), Clr-f mAk 10A6 (gestrichelte Linie) oder KACL mAk OMA6 (graue Linie) nachgewiesen. (E) Ko-Expression von Clr-a und Clr-f in 293T liefert keine neuartige Ligandenstruktur für Nkrp1 Rezeptoren.

4.6.3 Nachweis von Clr-a im Darm nach Clr-f Immunpräzipitation

Um zu überprüfen, ob unter physiologischen Bedingungen im Darm mögliche Clr-a/Clr-f Heterodimere gebildet werden, wurde eine Ko-Immunpräzipitation aus Lysaten von isolierten Dünndarm- und Kolonzellen von C57BL/6 Mäusen durchgeführt. Als Negativkontrolle wurden Lysate von Splenozyten verwendet. Die Präzipitation erfolgte mit dem Clr-f spezifischen mAk 10A6 beziehungsweise dem entsprechenden Isotyp.

C57BL/6 Zelllysate

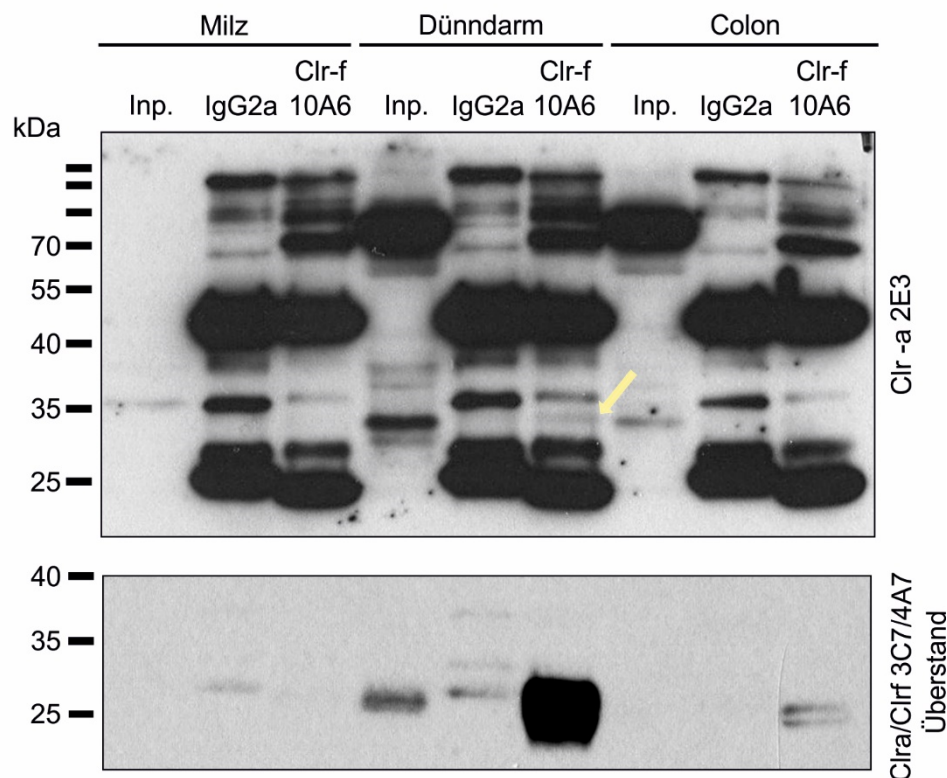


Abbildung 33. Koimmunpräzipitation von Clr-a und Clr-f aus intestinalen Primärzellen einer C57BL/6 Maus. Die Präzipitation erfolgte aus Dünndarm- und Colon-Zelllysaten einer C57BL/6 Maus unter Verwendung des Clr-f spezifischen mAk 10A6 sowie der entsprechenden Isotypkontrolle IgG2a. Zur Kontrolle wurden ebenso Lysate aus Splenozyten verwendet. Die Detektion der präzipitierten Proteine erfolgte nach Auftrennung mittels SDS-PAGE im Immunoblot unter Verwendung des Clr-a spezifischen mAk 2E3 und des kreuzspezifischen Clr-a/Clr-f mAk 3C7.

Die Detektion der präzipitierten Proteine im Immunblot mit dem Clr-a/Clr-f kreuzspezifischen mAk 3C7 ergab, dass Clr-f mit einer molekularen Masse von etwa 25 kDa in reichlicher Menge aus den Dünndarmlysaten präzipitiert wurde (Abbildung 33 unten). Jedoch konnte Clr-a mit dem Clr-a spezifischen mAk 2E3 mit einer molekularen Masse zwischen 35-40 kD nach Präzipitation mit Clr-f 10A6 nicht nachgewiesen werden (Abbildung 33 oben). Im Kolon hingegen wurden nur geringe Mengen an Clr-f präzipitiert, zudem können nur sehr wenige Mengen an Clr-a in der Input-Kontrolle nachgewiesen werden, sodass hier keine eindeutige Aussage gemacht werden kann. Somit liefert die Ko-immunpräzipitation keinen Anhaltspunkt für eine Clr-a/Clr-f Heterodimerbildung.

4.6.4 Clr-a Expression in Clr-f-defizienten Mäusen

Zuletzt wurde das Expressionsverhalten von Clr-a in Clr-f defizienten Mäusen näher betrachtet, da das Fehlen von Clr-f bei einer potenziellen Clr-a/Clr-f Heterodimerbildung mit einer Beeinträchtigung der Clr-a Expression einhergehen könnte. Konditionelle Clr-f Knockout Mäuse (*Tm1d^{-/-}*) wurden von Miriam Friede aus der Arbeitsgruppe Steinle in Zusammenarbeit mit dem Unternehmen Cyagen generiert und mittels quantitativer Echtzeit-PCR genotypisiert. Der Knockout basiert auf der Deletion des Exons 3 des *Clec2h* Gens, sodass eine Verschiebung des Leserasters in der Insertion eines Stop-Codons und in der Transkription einer kürzeren mRNA resultiert. Die Analyse der *Clec2h* Transkriptmenge mittels quantitativer Echtzeit-PCR offenbarte, dass die transkribierte mRNA in den Clr-f^{-/-} Mäusen mit einer Reduktion um etwa 50 % im Vergleich zur WT Maus relativ stabil ist (Abbildung 34 A). Auf Proteinebene konnte der Knockout im Dünndarm mittels Durchflusszytometrie und in der Mikroskopie bestätigt werden (Abbildung 34 B+C). Die Färbung mit dem Clr-f spezifischen mAk 10A6 von isolierten Dünndarmzellen zeigte einen kompletten Verlust von Clr-f auf der Zelloberfläche im Vergleich zur Littermate Kontrolle (Abbildung 34 B). Ebenso konnte das Protein in Maus Dünndarm-Gewebeschnitten nicht mehr nachgewiesen werden (Abbildung 34 C). Interessanterweise wird die Clr-a Expression durch das Fehlen von Clr-f nicht beeinträchtigt. Die Detektion von Clr-a mit dem spezifischen mAk 2E3 auf den Dünndarmschnitten zeigte in den Clr-f^{-/-} Mäusen eine ähnlich starke Färbung wie in den WT Mäusen.

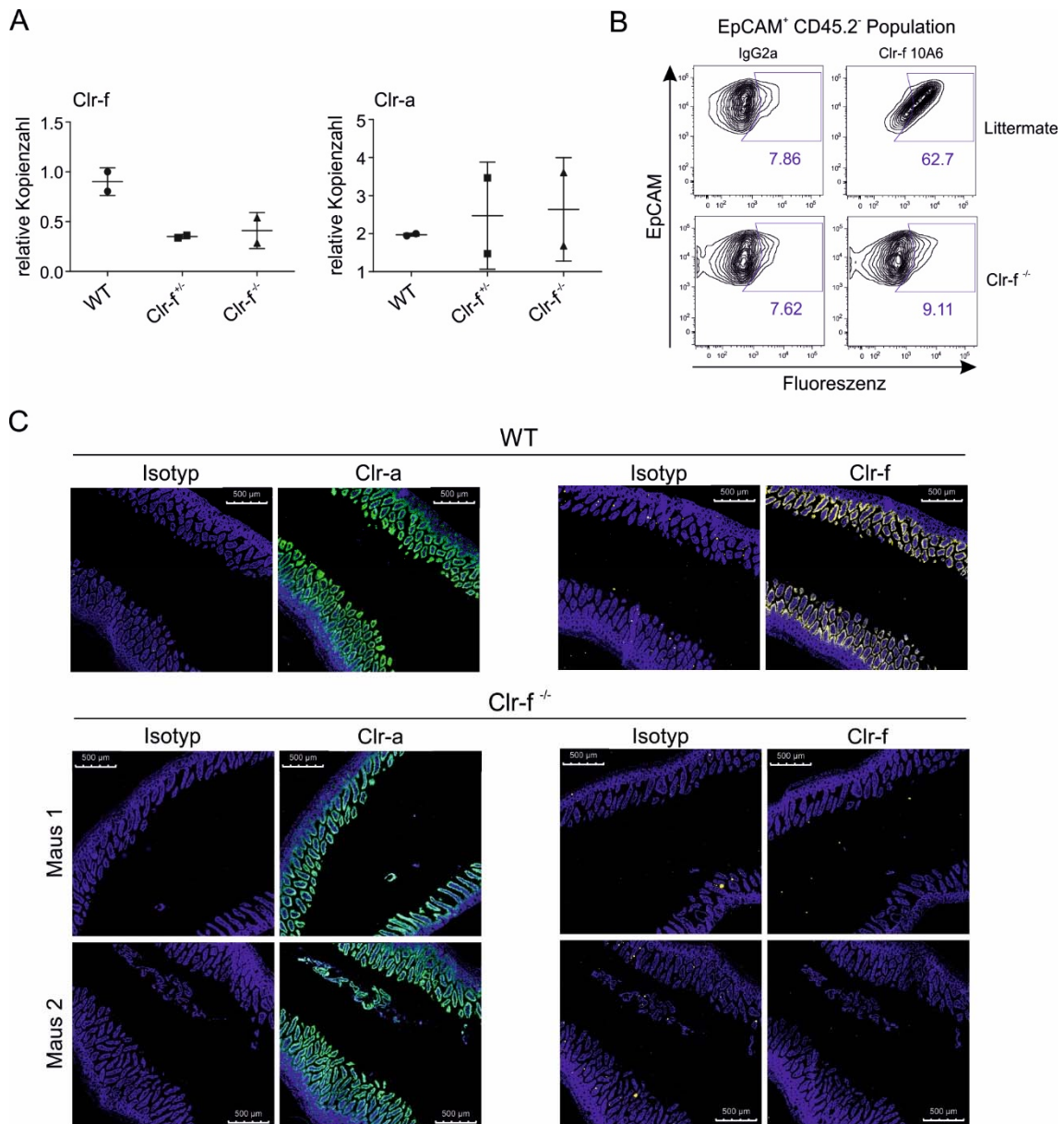


Abbildung 34. Clr-a wird von Darmepithelzellen Clr-f defizienter Mäusen exprimiert. (A) Dargestellt ist die relative Häufigkeit der *Clec2h* Transkripte in Clr-f defizienten C57BL/6 Mäusen (Tm1d^{-/-}). Die Daten wurden auf 18S rRNA normiert. Als Referenz diente eine Maus der WT Kontrollgruppe. (B) Durchflusszytometrie von primären Dünndarmzellen einer Clr-f defizienten Maus im Vergleich zur Littermate Kontrollgruppe nach Färbung mit einem Clr-f spezifischen Ratten mAk 10A6 sowie der Isotypkontrolle. Dargestellt ist die EPCAM⁺ CD45.2⁻ Epithelzellpopulation. (C) Mikroskopische Aufnahmen von Dünndarmgewebeschnitten von Clr-f defizienten Mäusen (mittlere (Maus 1) und untere (Maus 2) Reihe). Konstitutive Clr-a Expression wurde in WT Mäusen als Kontrolle gezeigt (obere Reihe). Die Detektion erfolgte mit dem Clr-a spezifischem mAk 2E3 (grün, links) und dem anti-Clr-f mAk 10A6 (gelb, rechts) sowie der Isotypkontrolle. Zur nukleären Färbung wurde DAPI verwendet.

4.7 Clr-a Expression unter inflammatorischen Bedingungen

4.7.1 Clr-a Expression wird nach Poly(I:C) - Behandlung stark herunterreguliert

Clr-b Moleküle nehmen eine bedeutende Rolle ein bei der immunologischen Überwachung von infizierten oder morphologisch veränderten Zelllinien und Geweben. Diese Erkenntnisse führten zur Überlegung, ob Clr-a an einem immunologischen Überwachungsprozess involviert sein könnte. Erste Anhaltspunkte würde eine Modulation der Expression auf transkriptioneller oder translationaler Ebene liefern. Um diese Fragestellung zu adressieren, wurden im Dünndarm von BALB/c Mäusen durch in vivo-Applikation von Poly(I:C) in einer Konzentration von 30 µg/g Körpergewicht inflammatorische Bedingungen induziert. Nach einem Beobachtungszeitraum von 16 h wurden die behandelten Mäuse getötet, der Darm entnommen und auf Clr-a Expression hin untersucht. Als Referenz dienten PBS-behandelte Mäuse, um einen möglichen Einfluss durch das Lösungsmittel zu überprüfen. Wie in Abbildung 35 A dargestellt war bei den Poly(I:C)- behandelten Mäusen eine Gewichtsabnahme von 7 % zu erkennen, was auf eine erfolgreiche Immunaktivierung durch Poly(I:C) hindeutete. Zudem waren bei den Mäusen auffällige Entzündungsvorgänge des Darmes durch bereits beschriebene Symptome wie Diarrhoe, vergrößerte Peyer Plaques und eine starke Flüssigkeitsansammlung im Lumen (McAllister et al., 2013) deutlich ersichtlich (Abschnitt 1.2.6). Was die Clr-a Expression betrifft, so wurde zunächst eine Echtzeit-PCR durchgeführt. Interessanterweise war eine starke Herunterregulierung der Clr-a Transkriptmenge (etwa 10-fach) gegenüber der PBS-behandelten Kontrollgruppe zu erkennen (Abbildung 35 B). Als Kontrolle wurden Clr-f und EpCAM gewählt. Im Gegensatz zu Clr-a sank bei diesen die Transkriptmenge zwar signifikant, jedoch nur marginal ab. In Übereinstimmung mit den Daten aus der Echtzeit-PCR zeigten sowohl Immunoblots von Lysaten des Dünndarms (Abbildung 35 C) als auch Immunfluoreszenzaufnahmen von Dünndarm-Gewebeschnitten (Abbildung 35 D) einen nahezu vollständigen Rückgang der Clr-a Expression in Poly(I:C) behandelten Mäusen auf.

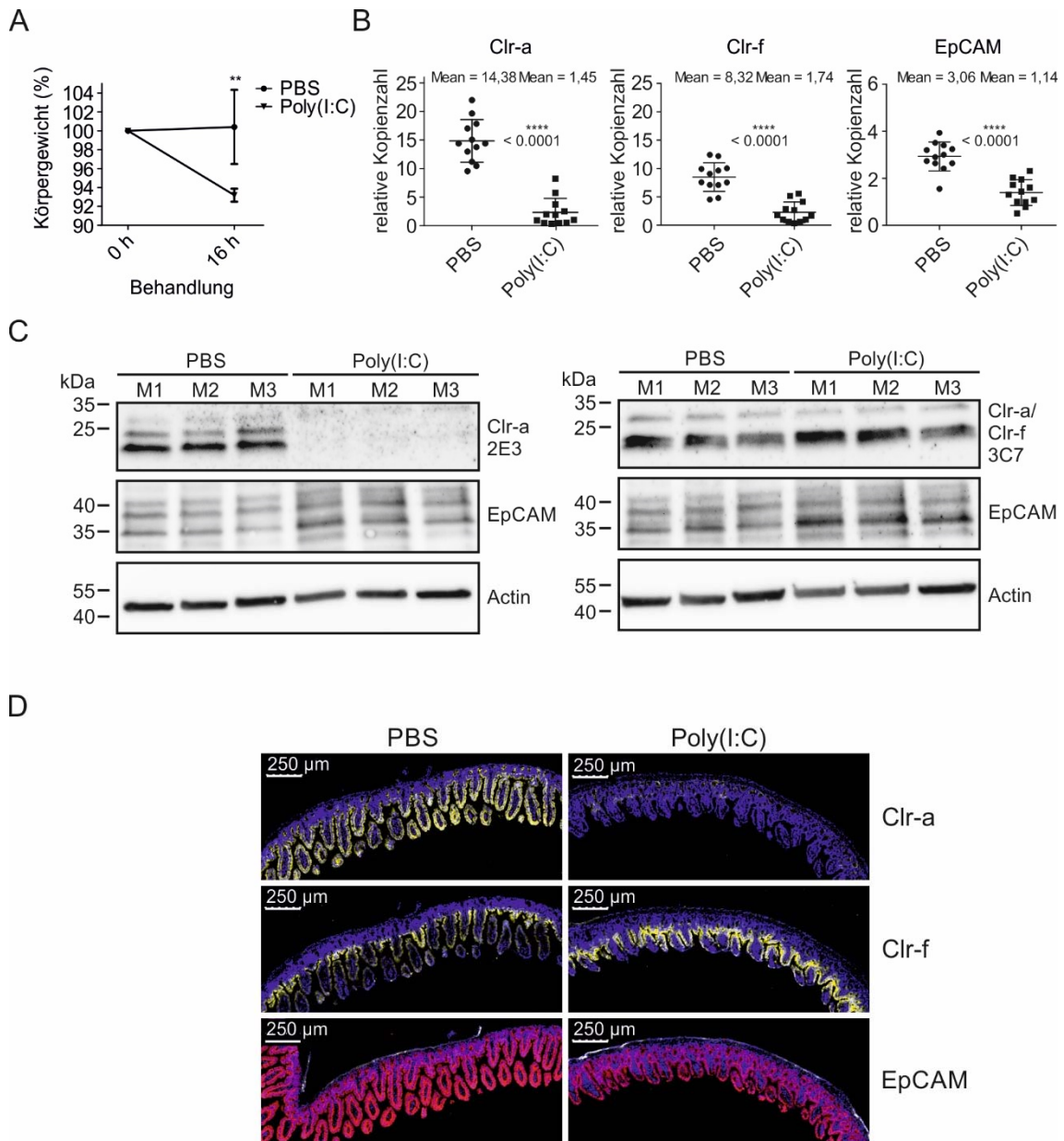


Abbildung 35. Starke Herunterregulierung von *Clr-a* nach Poly(I:C) induzierter Immunaktivierung. (A-D) 30 µg/g Körpergewicht Poly(I:C) wurden intraperitoneal in BALB/c Mäuse injiziert und diese nach einem Behandlungszeitraum von 16 h analysiert. Eine PBS-behandelte Gruppe diente als Kontrolle. (A) Diagramm zeigt die Gewichtsabnahme nach 16 h ausgehend vom Startpunkt (0 h) direkt nach Poly(I:C)-Applikation. Gezeigt wird ein repräsentatives von zwei unabhängig durchgeführten Experimenten mit drei Mäusen pro Gruppe. Abgebildet ist der Mittelwert mit der daraus resultierenden Standardabweichung. Zur statistischen Auswertung wurde ein ungepaarter t-test benutzt ($p < 0,05$). (B) Analyse der Verteilung von *Clec2e* (*Clr-a*), *Clec2h* (*Clr-f*) und *EpCAM* Transkripten in Dünndärmen von BALB/c Mäusen mittels quantitativer Echtzeit-PCR. Mäuse wurden wie oben beschrieben behandelt. TBP wurde als endogener Standard amplifiziert. Normierung der Daten erfolgte willkürlich auf die Transkriptmenge einer einzelnen Poly(I:C) behandelten Maus. Dargestellt sind die Ergebnisse aus vier unabhängigen Experimenten mit einer Anzahl von drei Mäusen pro Gruppe. Abgebildet ist der Mittelwert mit der daraus resultierenden Standardabweichung. Zur statistischen Auswertung wurde ein ungepaarter t-test benutzt ($p < 0,05$). (C) Immunoblot von Proteinlysaten aus Dünndärmen von behandelten BALB/c Mäusen mit drei Mäusen pro Gruppe bezeichnet als M1-M3. Zur Detektion wurden jeweils die mAk anti-*Clr-a* 2E3 oder anti-*Clr-a/Clr-f* 3C7 sowie anti-*EpCAM* A-20 verwendet. Proteinlysate wurden mit PNGaseF behandelt und anschließend mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. Gezeigt ist

eins von zwei unabhängigen Experimenten mit drei Mäusen pro Gruppe. (D) Mikroskop-Aufnahmen von Immunfluoreszenz-Färbungen von Längs-Gewebeschnitten von Dünndärmen von PBS oder Poly(I:C) behandelten Mäusen. Clr-a wurde mittels des mAk 2E3 (gelb; oben), Clr-f mittels des mAk 10A6 (gelb; mitte) und EpCAM mit dem polyklonalen Ak A-20 (rot; unten) visualisiert. DAPI wurde zur Gegenfärbung der Nuklei eingesetzt (blau). Eine repräsentative Färbung von 12 analysierten Mäusen ist abgebildet.

In Abbildung 35 C ist der Immunoblot abgebildet. Die Proteinlysate wurden vor der elektrophoretischen Auftrennung mit PNGaseF deglykosyliert. Die Verwendung des Clr-a spezifischen mAk 2E3 visualisierte in den PBS-behandelten Mäusen das endogene Clr-a mit einer molekularen Größe von etwa 24 kDa, ähnlich zu den Ergebnissen in Abbildung 24A. Nach Poly(I:C) Behandlung jedoch war keine Bande mehr zu erkennen. Um zu kontrollieren, dass der Verlust der Clr-a Moleküle nicht auf einen Verlust der Epithelzellen z. B. durch Apoptose zurückzuführen war, wurde ebenfalls EpCAM näher betrachtet. Unter Berücksichtigung von Aktin als Protein Ladekontrolle schien es jedoch, dass die EpCAM Expression sogar leicht zunahm. Zu erkennen sind hier zwei Proteinbanden zwischen 35 und 40 kDa, da der verwendete polyklonale EpCAM Antikörper A-20 zwei Proteinformen, das reife und das Vorläuferprotein, detektiert. Die bereits durch Dr. Stefan Leibelt beobachtete Zunahme der Clr-f Expression im Darm von BALB/c Mäusen nach Poly(I:C)-Behandlung (Leibelt et al., 2014), konnte hier ebenso bekräftigt werden (Abbildung 35 C+D). Der in dieser Arbeit produzierte kreuzreaktive Clr-a/Clr-f mAk 3C7 visualisierte im Immunoblot eine Bande direkt unterhalb von 25 kDa, die auch in Poly(I:C)-behandelten Mäusen nachzuweisen war. Zu erwähnen ist, dass Cr-f mit einer molekularen Masse von 24,2 kDa und Clr-a (23,9 kDa) in deglykosylierter Form nicht eindeutig voneinander unterschieden werden konnten. In Anbetracht des fast vollständigen Clr-a Verlustes in Poly(I:C)-behandelten Mäusen, in Übereinstimmung mit den Mikroskopieaufnahmen (Abbildung 35 D), konnte daher auf eine Zunahme der Clr-f Expression geschlossen werden. Vergleichbare Ergebnisse konnten bei Verabreichung einer geringeren Poly(I:C) Dosis von 15 µg/g Körpergewicht erzielt werden (nicht gezeigt). Zusammengefasst vermitteln diese Daten eindeutig, dass in einem inflammatorischen Umfeld verursacht durch Poly(I:C) Verabreichung eine deutliche Herunterregulierung der Clr-a Expression im intestinalen Epithel direkt entgegengesteuert mit einer Expressionszunahme des am nächsten zu Clr-a verwandten Moleküls Clr-f einhergeht.

4.7.2 Poly(I:C) vermittelte Expressionsregulation von Clr-a

Die Verabreichung des immunstimulierenden Adjuvans Poly(I:C) löst eine Reihe von immunregulatorischen Prozessen aus. Die in vivo Injektion in adulte Mäuse führt zur rapiden Ausschüttung einer Reihe proinflammatorischer Cytokine wie IL-6, IL-10, IL-12 und TNFα sowie diverser

Chemokine. Zudem wird die Produktion der Typ I Interferone IFN α und IFN β sowie IFN γ induziert. Dies resultiert neben der verstärkten Reifung der antigen-präsentierenden Zellen in einer erheblichen Aktivierung von CD8 T und NK Zellen (Lacroix-Lamandé et al., 2014; Verdijk et al., 1999). Die Aktivierung dieser Prozesse wird über TLR3 vermittelt (siehe Abschnitt X Einleitung), sodass TLR3^{-/-} Mäuse und Zellen in der Reaktionsfähigkeit auf Poly(I:C) und virale dsRNA defizient sind. Um die im Kapitel zuvor beschriebenen Ergebnisse einer Poly(I:C) vermittelten Clr-a Herunterregulation zu bekräftigen, wurden TLR3 defiziente C57BL/6 Mäuse auf Clr-a Expression hin untersucht. Die TLR3^{-/-} Mäuse wurden von Prof. Stefan Bauer (Marburg) zur Verfügung gestellt. Bei diesen TLR3^{-/-} Mäusen ist das dritte und das vierte Exon der TLR3 kodierenden Region durch eine Neomycin-Resistenz Genkassette ersetzt (Honda et al., 2003). Die Analyse der *Clec2e* Transkriptmenge mittels Echtzeit-PCR demonstrierte in Übereinstimmung mit den in Abbildung 35B gezeigten Daten eine signifikante Reduktion (8-fach) der *Clec2e* Transkripte in Poly(I:C) behandelten Mäusen im Vergleich zur PBS-Kontrollgruppe (Abbildung 36 A). Diese Abnahme der *Clec2e* Transkripte wurde nicht in TLR3^{-/-} Mäusen beobachtet. Im Vergleich zu WT Mäusen war keine Abnahme der Clr-a Moleküle in der Immunfluoreszenz von Dünndarm Gewebeschnitten in Poly(I:C) behandelten TLR3^{-/-} Mäusen zu beobachten (Abbildung 36 B). Daher ist der Verlust der Clr-a Expression in Poly(I:C) behandelten Mäusen von der Induktion der TLR3 Signalkaskade abhängig.

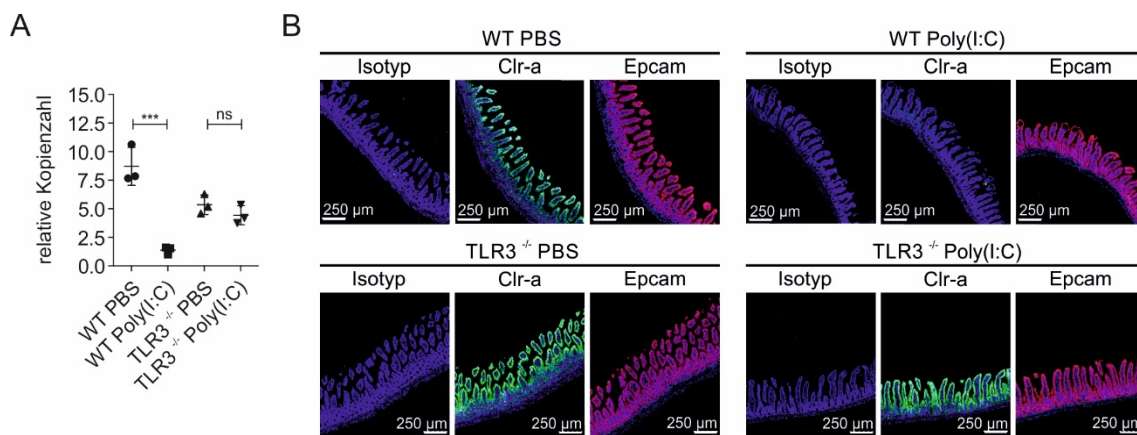
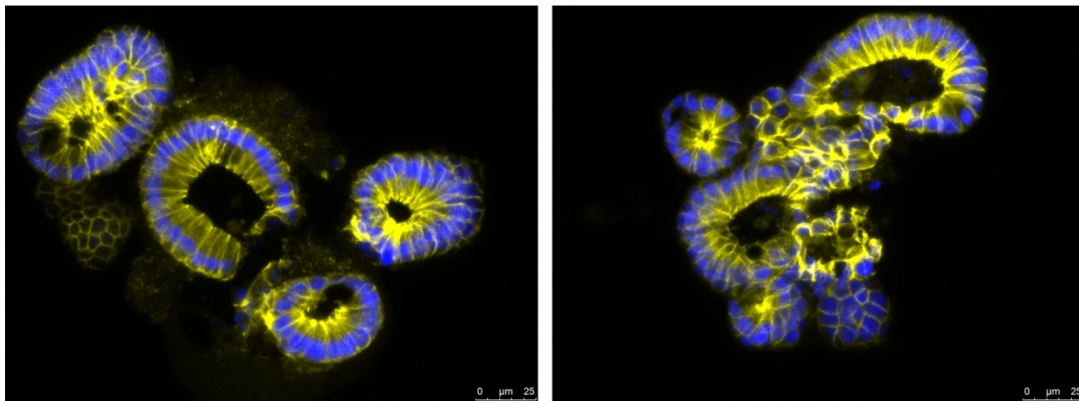


Abbildung 36. Modulation des Clr-a Expressionsverhaltens ist TLR3 abhängig. (A-B) 30 μ g/g Körpergewicht Poly(I:C) wurden intraperitoneal in C57BL/6 Mäuse injiziert und diese nach einem Behandlungszeitraum von 16 h analysiert. Eine PBS-behandelte Gruppe diente als Kontrolle. (A) Quantitative Echtzeit-PCR Analyse der *Clec2e* Transkriptrate in Dünndärmen von C57BL/6 WT im Vergleich zu TLR3^{-/-} Mäusen. Als endogenes Kontrollprotein wurde 18SrRNA verwendet. Normierung der Daten von drei Mäusen pro Gruppe erfolgte willkürlich auf die Transkriptmenge einer Poly(I:C) behandelten WT Maus. Abgebildet ist der Mittelwert mit der daraus resultierenden Standardabweichung. Zur statistischen Auswertung wurde eine Ein-Weg Varianzanalyse mit einem Tukey-Test als Posthoc-Analyse durchgeführt. (B) Mikroskop-Aufnahmen von Immunfluoreszenz-Färbungen von Längs-Gewebeschnitten von Dünndärmen von PBS oder Poly(I:C) behandelten WT gegen TLR3^{-/-} Mäusen. Clr-a wurde mittels des mAk 2E3 (grün; mitte) und des Isotyps Ratten IgG2a als Kontrolle (links), EpcAM mit dem polyklonalen Ak A-20 (rot; rechts) detektiert. DAPI wurde zur nukleären Gegenfärbung verwendet (blau). Eine repräsentative Färbung von drei analysierten Mäusen ist dargestellt.

4.8 Expressionsregulation von Clr-a in intestinalen Organoiden

Zur Identifizierung bestimmter Immunzellmediatoren, die während eines Entzündungsgeschehens auf die endogene Clr-a Expression einwirken könnten, wurde nach einem geeigneten in vitro Untersuchungsmodell gesucht. Hierfür wurden zwei murine intestinale Epithelzelllinien mittels quantitativer Echtzeit-PCR auf das Vorhandensein von *Clec2e* Transkripten analysiert. Jedoch wiesen sowohl die MODE-K Zellen (Vidal, Grosjean, evillard, Gespach, & Kaiserlian, 1993) als auch die IEC-Mx2Luc-10 Zellen (Schwerk et al., 2013) keine *Clec2e* Transkripte auf (Daten nicht gezeigt). Die Analyse von intestinalen epithelialen C57BL/6 Organoidkulturen (Sato et al., 2009b) hingegen mittels quantitativer Echtzeit-PCR und Immunfluoreszenz zeigten eine eindeutige Expression von Clr-a sowohl auf Transkript- als auch auf Proteinebene (Abbildung 37 A+B). Die Wirkung verschiedener Cytokine auf die Clr-a Expression wurde somit in diesen Langzeitkulturen näher betrachtet. Die Isolation und Kultivierung der intestinalen Kryptzellen sowie die Stimulation der Organoide erfolgte in der Arbeitsgruppe um Henner Farin am Georg-Speyer-Haus. Zur Stimulation wurden IL-22, TNF α , IFN γ und IFN β gewählt. IL-22 ist an mukosalen Grenzflächen nach Bindung an den IL-22R an der Förderung von Entzündungsvorgängen, an der Geweberegenerierung und der antimikrobiellen Immunität des Darmes beteiligt (Sonnenberg, Fouser, & Artis, 2011). TNF α spielt bei der Initiierung von entzündlichen Darmerkrankungen, wie Colitis ulcerosa oder Morbus Crohn eine bedeutende Rolle (Weigmann et al., 2007). IFN γ ist an der Regulierung der intestinalen epithelialen Homöostase beteiligt (Nava et al., 2010) vorwiegend durch Aktivität gegenüber verschiedenen viralen Pathogenen, darunter Rotaviren, Reoviren und Noroviren (Mahlaköiv, Hernandez, Gronke, Diefenbach, & Staeheli, 2015; J. Pott et al., 2011). Die Stimulation der Organoide (Abbildung 37 B) und die damit einhergehende Signalinduktion (Daten nicht gezeigt), hatte jedoch keinen Einfluß auf die *Clec2e* Transkriptrate, was mittels quantitativer Echtzeit-PCR eindeutig gezeigt werden konnte (Abbildung 37 B). Weitere Untersuchungen der Expressionsmodulation wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt.

A



B

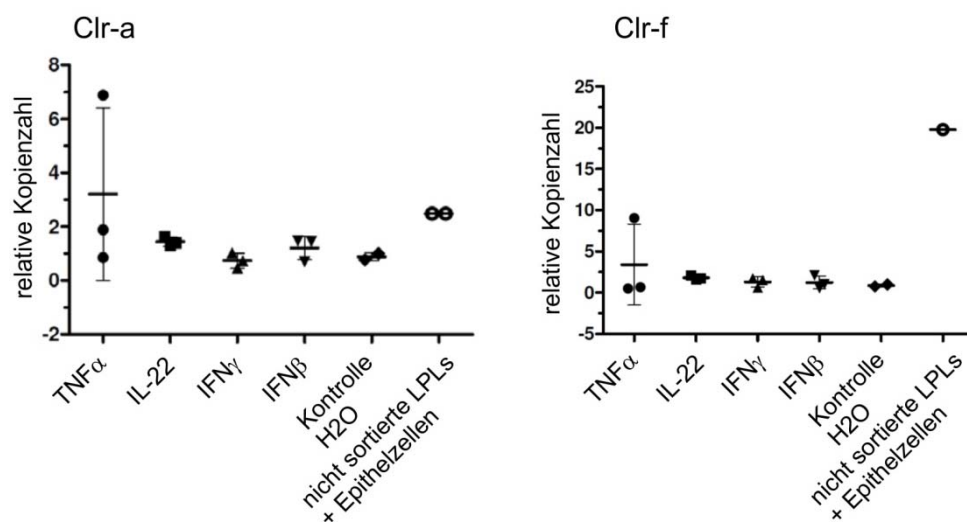


Abbildung 37: IL-22, IFN β , TNF α oder IFN γ zeigen keinen Einfluss auf die Expression von Clr-a auf intestinalen Organoidkulturen aus C57BL/6 Mäusen. (A) Mikroskopische Aufnahmen von Organoid Kryoschnitten. Die Detektion von Clr-a (gelb) erfolgte mit dem Clr-a spezifischen mAk 2E3 sekundär gefolgt von einem Cy3-konjugierten Ziege-anti-Ratte IgG. Zur nukleären Gegenfärbung wurde DAPI verwendet. (B) Dargestellt ist die relative Häufigkeit von *Clec2e* (Clr-a) und *Clec2h* (Clr-f) Transkripten in intestinalen Organoidkulturen bestimmt mittels quantitativer Echtzeit-PCR. Die Organoiden wurden mit verschiedenen Cytokinen beziehungsweise Wasser als Kontrolle stimuliert. Die Analyse isolierter C57BL/6 Darmprimärzellen (Epithelzellen und Lamina Propria Lymphozyten (LPLs)) dienten zum Vergleich. Alle Daten wurden auf 18S rRNA normiert.

5 Diskussion

5.1 Spezifische Expression von Clr-a im Darmepithel

Einige Vertreter der im Natürlichen Killergenkomplex (NKC) kodierten Familie der C-Typ Lektin-ähnlichen Rezeptoren zeigen ein gewebespezifisches Expressionsmuster auf. Die Expression ist bei einigen Vertretern nicht nur auf ein einzelnes Gewebe, sondern sogar auf einen bestimmten Zelltyp beschränkt. So wird das humane KACL auf Keratinocyten (Spreu, Kienle, Schrage, & Steinle, 2007), das humane AICL auf NK-Zellen und myeloiden Zellen (Klimosch et al., 2013) und das außerhalb des NKC kodierte BACL vor allem im Gehirn (Lysenko, Schulte, Mittelbronn, & Steinle, 2013) exprimiert. Diese gewebespezifische Expression der C-Typ Lektin-ähnlichen Rezeptoren wird sowohl im Menschen als auch in der Maus beschrieben. Innerhalb der Maus Clr-Familie ist zu beobachten, dass Clr-b eine breite und einheitliche Expression in vielen Geweben aufzeigt (Carlyle et al., 2004; Fine et al., 2010; Leibelt et al., 2014; B. Plougastel et al., 2001). Hingegen ist die Expression von Clr-g vorwiegend auf hämatopoetische Zellen beschränkt (Leibelt et al., 2014). Diese Beobachtungen führen zu der Annahme, dass einige CLEC2 Moleküle in Mensch und Maus an einer gewebespezifischen Immunüberwachung beteiligt sind.

Das mukosale Epithel ist sowohl physikochemischem als auch biologischem Stress ausgesetzt und verfügt über komplexe immunologische Mechanismen die intestinale Homöostase beizubehalten. Im Falle eines Ungleichgewichts müssen zerstörte Zellen entsorgt, eine lokale Entzündung kontrolliert und zudem die Heilung des Gewebes induziert werden. Für einige Vertreter ist die Involvierung der C-Typ Lektin-ähnlichen Rezeptoren an dem komplexen Netzwerk der intestinalen Immunüberwachung beschrieben. Liganden des aktivierenden NKG2D Rezeptors werden unter anderem auf IECs exprimiert (Groh et al., 1996) und bei chronischen Darmerkrankungen, wie einer Dickdarmentzündung (Colitis) in Mäusen (Ito et al., 2008) oder Morbus Crohn in Menschen (Allez et al., 2007), heraufreguliert. NKG2D wird auf NK Zellen, CD8⁺αβ T cells, γδ T cells, and iNKT Zellen exprimiert. Normalerweise werden die NKG2D Liganden auf der Zelloberfläche von gesunden, nicht gestressten Zellen nur schwach exprimiert (Vadstrup et al., 2017). Die NKG2D Liganden MICA, MICB und ULBP4-6 kommen auf B-Zellen, Monozyten, vaskulärem Endothelium und mukosalem Epithel in entzündeten Därmen von Morbus Crohn Patienten vor (Vadstrup et al., 2017). Es wird davon ausgegangen, dass die intestinale Induktion der NKG2D Liganden gekoppelt mit einer gleichzeitigen Liganden-induzierten Herunterregulierung der NKG2D bei Patienten mit Morbus Crohn sowohl eine Aktivierung als auch Rekrutierung von NKG2D⁺ Lymphozyten in das entzündete Gewebe bewirkt.

Einige Ly49 und Nkrp1 Rezeptoren werden ebenfalls in Darm exprimiert (Qiang Zhang et al., 2012). NK1.1 Rezeptoren werden zum Beispiel auf einer Subpopulation intestinaler T-Zellen und einigen NKp46⁺ ILCs exprimiert (Kirkham & Carlyle, 2014). Erst kürzlich wurde in der Arbeitsgruppe von Herrn

Prof. Steinle publiziert, dass das NKC-kodierte C-Typ Lektin-ähnliche Molekül Clr-f nahezu ausschließlich auf differenzierten intestinalen Epithelzellen der Maus vorkommt (Leibelt et al., 2014). Interessanterweise stimmt die IEC-spezifische Expression von Clr-f mit der räumlichen Expression dessen bekannten Rezeptors Nkrp1g auf den intraepithelialen Lymphozyten (IELs) überein. Nkrp1g wird vor allem auf den „natürlichen“ IELs mit einem gdTCR^{bright} NKG2A- Phänotyp exprimiert. Somit stellt das im NKC räumlich benachbart kodierte Liganden-Rezeptorpaar Clr-f-Nkrp1g ebenfalls ein Ligandenpaar dar, welches bei einer spezifischen Immunüberwachung des Darmes beteiligt sein könnte (Leibelt et al., 2014).

In dieser Arbeit wird erstmalig Clr-a, ein weiteres Mitglied der Maus Clr Familie, charakterisiert, welches in den Kontext der intestinalen Immunüberwachung gebracht wird. Interessanterweise zeigen quantitative Echtzeit-PCR Studien (Abbildung 11) und Immunfluoreszenzaufnahmen (Abbildung 24, Abbildung 25), dass Clr-a genauso wie Clr-f ausschließlich im Gastrointestinaltrakt auf Epithelzellen (IECs) vorzufinden ist. Bezüglich der Lokalisierung von Clr-a innerhalb der Epithelzelle zeigen die Immunfluoreszenzaufnahmen, dass Clr-a nahezu gleichmäßig und konstitutiv von den IECs sowohl auf der apikalen als auch basolateralen Epithelzellseite und ebenfalls intrazellulär exprimiert wird (Abbildung 24 B-D). Die strikte Polarität des epithelialen Gewebes geht mit unterschiedlichen Funktionen der apikalen gegenüber der basolateralen Seite, auf der die IELs lokalisiert sind, einher. Die konstitutive und gleichmäßige Expression auf beiden Seiten der Epithelzelle liefert eine gute Voraussetzung dafür, dass Clr-a für einen potenziellen Interaktionspartner überall zugänglich ist.

Des Weiteren ist die Clr-a Expression nicht auf einen spezifischen Abschnitt innerhalb des Gastrointestinaltraktes der Maus beschränkt, sondern in allen Teilen des Dünndarmes (Duodenum, Ileum, Jejunum) und des Kolons präsent (Abbildung 25 A). Aufgrund dieses Expressionsmusters stellt Clr-a ebenso wie Clr-f einen charakteristischen Marker für intestinale Epithelzellen in der Maus dar. Es scheint, dass weder strukturelle noch funktionelle Unterschiede der verschiedenen Bereiche des Gastrointestinaltraktes einen erheblichen Einfluss auf das Expressionsverhalten von Clr-a haben. Unter Betrachtung von Abbildung 11 fällt jedoch auf, dass die größte Transkriptmenge im Jejunum und die niedrigste Transkriptmenge im Ileum und Kolon descendens vorzufinden ist. Die Gründe für die unterschiedliche Verteilung der Clr-a Transkripte in den diversen Bereichen des Gastrointestinaltraktes wurden in dieser Arbeit nicht untersucht. Unterschiede innerhalb des Dünndarmes beziehungsweise des Kolons wären z. B. die Variabilität und Dichte des Mikrobioms, der immunstimulierenden Komponenten sowie der Zusammensetzung der Immunzellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems unterhalb des Epithelzellsaums.

Wie die meisten Vertreter der C-Typ Lektin-ähnlichen Rezeptoren wird Clr-a als ein Disulfid-verknüpftes homodimeres Glykoprotein auf der Zelloberfläche exprimiert (Abbildung 17, Abbildung

24). Bemerkenswert ist, dass die Clr-a Expression im Gegensatz zu Clr-f nicht nur auf die differenzierte Epithelzellen beschränkt ist (Leibelt et al., 2014) (Abbildung 25), sondern auch in den Krypten in der epithelialen Stammzellnische (Abbildung 24 C) vorkommt. Dies spricht für die Möglichkeit, dass Clr-a eine Rolle beim Schutz sowie der Regeneration des Epithelzellsaums spielt.

5.2 Monoklonale Clr-a Antikörper 2E3 und 3C7

Zur Untersuchung des Expressionsmusters von Clr-a wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst ein monoklonaler spezifischer Clr-a Antikörper generiert, da dieser bislang nicht verfügbar war. Die Produktion des Antikörpers erfolgte unter Anwendung der von Cesar Milstein und Georges J. F. Köhler im Jahre 1975 entwickelten Hybridomatechnologie (Köhler & Milstein, 1975). Durch die Fusion der B-Zellen nach Immunisierung mit einem körperfremden Protein, einem Antigen, mit den immortalisierten Myelomazellen, werden immortalisierte B-Zell Hybridome erzeugt, die unbegrenzte Mengen an Antikörper produzieren können. Unter Anwendung dieser Technologie wurden in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Steinle unter anderem bereits monoklonale Antikörper für Nkp65, KACL, AICL, Clr-f und Nkrp1g sowie humane NKG2D-Liganden produziert. Nach der Immunisierung wird im Prozess einer humoralen Immunantwort das vollständige Antigen von den membranständigen Antigenrezeptoren (BCR) gebunden. Anschließend wird das Antigen internalisiert, prozessiert und in Form von Peptiden auf der Zelloberfläche zusammen mit den MHC (engl. major histocompatibility complex) -II-Molekülen präsentiert. Die zweite Aktivierung erfolgt durch Interaktion mit einer CD4⁺-T-Helferzelle, die eine Rezeptorspezifität gegen die antigenpräsentierende B-Zelle besitzt. Durch diese Bindung wird eine Signalkaskade in Gang gesetzt, wodurch die gebundene B-Zelle zu einer Antikörper-sezernierenden B-Zelle differenziert (Kayser, Böttger, Deplazes, Haller, & Roers, 2014).

Besteht ein Epitop aus einer Folge von aneinander gereihten Aminosäuren in der Primärstruktur wird es als lineares oder kontinuierliches Epitop bezeichnet (Barlow, Edwards, & Thornton, 1986; Van Regenmortel, 1987). Werden hingegen vom Paratop verschiedene Abschnitte der Aminosäuresequenz erkannt, die aufgrund der Faltung innerhalb der Sekundärstruktur, Tertiär- oder Quartärstruktur eng benachbart liegen, liegt ein diskontinuierliches beziehungsweise Konformationsepitop vor. Lineare Epitope sind in der Regel 7-17 Aminosäuren lang, bestehen aus hydrophoben Aminosäuresequenzen.

Wie anhand der Epitopkartierung gezeigt werden konnte, erkennen die in dieser Arbeit produzierten monoklonalen Clr-a Antikörper 2E3, 4G7 und 3C7 alle ein lineares Epitop. Dies erklärt auch die Einsatzmöglichkeiten dieser Antikörper in den unterschiedlichen getesteten Methoden. Die Antikörper können im Immunoblot und in der Immunfluoreszenz nach Demaskierung des Epitops spezifisch ohne unerwünschte Hintergrundsignale eingesetzt werden. In der Durchflusszytometrie konnte hingegen im Vergleich zum anti-FLAG Antikörper nur ein viel schwächeres Signal und somit weniger Clr-a auf der

Oberfläche detektiert werden. Somit ist der Einsatz dieser monoklonalen Antikörper in der Durchflusszytometrie nur eingeschränkt möglich.

5.3 Intrazelluläre Retention von Clr-a

Zur Untersuchung der ektopen Expression von Clr-a wurden CHO und 293T Zellen als Expressionssysteme verwendet. Die ektopische Expression von Clr-a auf transfizierten 293T und CHO Zelllinien zeigte im Vergleich zu Clr-f sowie anderen Molekülen der Clr Familie (Clr-b, Clr-c und Clr-g) eine schwächere Oberflächenpräsenz (Abbildung 18). Um eine mögliche Retentionsregulation zu adressieren, wurden einzelne Domänen und Teilabschnitte aus dem zu Clr-a verwandten Clr-f in Clr-a inseriert (Abbildung 22) und die Expression durchflusszytometrisch nach transienter Expression in 293T analysiert (Abbildung 21). Nach Eingrenzung bestimmter Bereiche wurden ebenso Punktmutationen durchgeführt und die Clr-a Expression überprüft. Die im Vergleich zu anderen Clr Molekülen schwächere Expression von Clr-a auf der Zelloberfläche konnte dem carboxyterminalen Ende der Clr-a stalk-Region (Abbildung 21 D+G) sowie einer bestimmten Aminosäureposition im cytoplasmatischen Anteil (Abbildung 21 E+F), Alanin an Position 35, zugeordnet werden. Dabei geht die reduzierte Oberflächenexpression mit einer unvollständigen Glykosylierung von Clr-a einher, da die Mehrheit der Clr-a Glykoproteine im Gegensatz zu Clr-f durch Endoglykosidase H gespalten werden konnte (Abbildung 19). Somit wurde gezeigt, dass die Mehrheit der Clr-a Glykoproteine intrazellulär, das heißt im endoplasmatischen Retikulum oder im Golgi-Apparat lokalisiert ist. Der genaue Mechanismus dahinter wurde in dieser Arbeit nicht betrachtet. Eine mögliche Begründung hierfür liegt darin, dass in den verwendeten Zelllinien Moleküle nicht in ausreichender Anzahl vorhanden sind oder komplett fehlen, die für eine vollständige Prozessierung und Oberflächenexpression von Clr-a erforderlich sind. Diese könnten an den stalk-Bereich oder die cytoplasmatische Domäne binden und somit zu einem effizienteren Oberflächenexport beitragen. Eine intrazelluläre Akkumulation der Clr-a Moleküle wurde auch bei intestinalen Epithelzellen ex vivo beobachtet (Abbildung 24 A). Daher reflektiert die vorwiegend intrazelluläre Akkumulation von Clr-a Molekülen in den Zelllinien auch das physiologische Expressionsverhalten in den Epithelzellen.

Des Weiteren könnten diese spezifischen Regionen innerhalb des Clr-a Moleküls ebenso Interaktionsstellen liefern für zelluläre Bindepartner, die Clr-a aktiv intrazellulär restringieren. Der genaue molekulare Mechanismus der intrazellulären Clr-a Retention wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiterverfolgt. Spezifische bekannte Retentionsmotife wurden in der Clr-a Aminosäuresequenz nicht identifiziert.

In Bezug auf die Punktmutation Alanin zu Glycin innerhalb der cytoplasmatischen Domäne von Clr-a liefert eine unterschiedliche Proteinfaltung eine mögliche Erklärung. Alanin besitzt eine

Methylgruppenseitenkette und fördert und erhält α -helikale Strukturen, bietet somit weniger Flexibilität (Joshi Aditya D., 2006; López-Llano, Campos, & Sancho, 2006). Glycin hingegen fördert eine flexible Konformation. Es ist anzunehmen, dass die flexiblere Region im cytoplasmatischen Bereich in der Umgebung von AS-Position 36 von Clr-f die Bindung eines bestimmten Kofaktors begünstigt oder im Falle einer aktiven Restriktion von Clr-a verhindert. Zukünftig ist es sinnvoll anhand von Immunpräzipitationen und anschließender massenspektrometrischer Analysen mögliche endogene Bindepartner zu identifizieren.

Die intrazelluläre Akkumulation ist bereits für einige humane Vertreter des NKC beschrieben. AICL (engl. activation induced C-Type lectin) ist in ruhenden NK-Zellen im Golgi-Komplex lokalisiert und wird erst nach Stimulation an die Zelloberfläche exportiert. Bei diesem Protein ist ein Lysin an Position 7 im cytoplasmatischen Teil für die Expressionsregulation relevant (Klimosch et al., 2013). Eine Ubiquitinierung und anschließende lysosomale Degradation wird bei AICL in Betracht gezogen. Ein weiteres Beispiel liefert humanes CD69, welches in ruhenden Lymphozyten ebenso intrazellulär lokalisiert ist. Die exakte Lokalisierung ist jedoch bislang unklar.

Die Aufklärung des genauen molekularen Mechanismus für die intrazelluläre Retention von Clr-a würde in weiterführenden Studien einen wichtigen Beitrag zum Verständnis dessen Funktion liefern. Die ersten grundlegenden Beobachtungen wurden in diesem Abschnitt geschildert.

5.4 Identifizierung eines Clr-a Interaktionspartners

Die Identifikation eines potenziellen Clr-a Interaktionspartners ist zur Klärung der funktionellen Relevanz von Clr-a innerhalb der intestinalen Umgebung von entscheidender Bedeutung. Der *Clec2e* Genlocus, der innerhalb der CLEC2 Genfamilie für das C-Typ Lektin-ähnliche Molekül Clr-a kodiert, ist auf Chromosom 6 im Natürlichen Killer-Genkomplex (engl. Natural Killer Gen Complex (NKC)) der Maus lokalisiert (Vogler & Steinle, 2011). Benachbart zu *Clec2e* befinden sich Genloci zweier Vertreter der NKC-kodierten Nkrp1 Familie, darunter Nkrp1e, das ein Pseudogen darstellt, sowie Klrb1, das für den Rezeptor Nkrp1f kodiert. Die räumlich enge genetische Verknüpfung der Rezeptor-Ligandenpaare innerhalb des NKC, die für Repräsentanten der Nkrp1 und der CLEC2 Genfamilie beschrieben ist (Carlyle et al., 2004; Chen et al., 2011; Iizuka et al., 2003; Kveberg et al., 2011) führte zu der Überlegung, dass die Nkrp1 Familie, hier insbesondere Nkrp1f, ebenfalls einen Rezeptor für Clr-a in trans repräsentieren könnte. So binden Clr-c, Clr-d und Clr-g an Nkrp1f und Clr-d, Clr-f und Clr-g an Nkrp1g und Nkrp1b/d an Clr-b (Carlyle et al., 2004; Kveberg et al., 2011). Eine Interaktion der Nkrp1 Rezeptoren Nkrp1a, -c, -d, -f und -g wurde unter Einsatz von BWN.3G eGFP Reporterzellen untersucht, welche ein Fusionsprotein bestehend aus der Clr-a CTLD verknüpft an den stalk-Bereich von Clr-f stark an der Oberfläche exprimierten (Abbildung 26 A-C). Auch die Nkrp1 Rezeptoren zeigten auf 293T Zellen

eine starke Oberflächenexpression (Abbildung 26 E). Obwohl sich die Reporterzellen erfolgreich mit einem M2-anti-FLAG Antikörper stimulieren ließen (Abbildung 26 D), war nach einer Kokultur mit den Nkrp1-tragenden Zellen keine Aktivität der Reporterzellen ersichtlich (Abbildung 26 F). Beinahe alle Klrp1 (Nkrp1) Transkripte sind im Darm vorzufinden (Qiang Zhang et al., 2012), sodass die Voraussetzung für eine funktionelle Interaktion möglich wäre. Die Expression von Nkrp1a ist auf IELs aufgezeigt, hier vorwiegend auf CD8 α ⁺ Zellen (Denning et al., 2007). Nkrp1f Transkripte sind in der Maus zudem auf dendritischen Zellen/ Monocyten Vorläuferzellen des Knochenmarks und endothelialen Zellen der Lymphknoten beschrieben, ebenso auf antigen-präsentierenden Zellen (W. Tian et al., 2005; Qiang Zhang et al., 2012).

Aufgrund des breiten Reaktivitätsmusters der Nkrp1g und Nkrp1f Rezeptoren wurden diese als „Sensoren“ beschrieben, die den globalen Zustand der Clr Expression in Zellen erkennen (Kveberg et al., 2011). Clr-a ist hier somit nicht mit inbegriffen. Eine mögliche Interaktion von Clr-a mit Nkrp1f oder Nkrp1g wurde bereits in der Arbeitsgruppe um John T.Vaage bei Studien mit anderen Clr Molekülen aufgegriffen und untersucht. In Übereinstimmung mit den Daten in dieser Arbeit wurde Clr-a weder durch eine Nkrp1f- noch eine Nkrp1g-Reporterzelllinie erkannt (Kveberg et al., 2011). Allerdings wurden in dieser Studie 293T Zellen verwendet, die eine sehr geringe Oberflächenexpression von Clr-a aufwiesen. Im Falle einer geringen Affinität zu einem möglichen Rezeptor oder einer interaktionsbedingten Clusterbildung ist eine starke Oberflächenpräsenz notwendig. Aufgrund der in dieser Arbeit gewonnenen Daten (Abschnitt 3.3.2.3) konnte durch die Insertion des Clr-f stalk-Bereiches eine starke Clr-a Oberflächenexpression (Abbildung 26 A+C) und letztendlich aussagekräftige Ergebnisse erzielt werden. Somit nimmt Clr-a innerhalb der Clr Familie eine gesonderte Stellung ein und fällt nicht in das vorgegebene Modell der genetisch verknüpften Rezeptor-Ligandenpaarbildung (Iizuka et al., 2003). Die besondere Abgrenzung ist vor allem im separaten phylogenetischen Zweig innerhalb der Clr Familie zum Clr-a am nächsten verwandten Protein Clr-f zu erkennen, welches in das Modell passt und an den inhibierenden Rezeptor Nkrp1g auf IELs im Darm bindet (Leibelt et al., 2014).

Des Weiteren wurden intestinale Zellpopulationen auf die Präsenz eines möglichen Clr-a Rezeptors analysiert, die in einer starken Kooperation mit den Clr-a exprimierenden Epithelzellen stehen. Jedoch konnte weder auf den Epithelzellen selbst noch auf den IELs oder weiteren isolierten Zellpopulationen der Lamina Propria (B-Zellen oder T-Zellen) ein Rezeptor für Clr-a identifiziert werden (Abbildung 26 G+H).

Um die Suche mit einem anderweitigen Ansatz zu gestalten, wurden Clr-a Fc Fusionsproteine generiert, bei denen der stalk-Bereich und die Clr-a CTLD über einen GS-Linker an einen humanen IgG1 Fc-Teil verknüpft waren (Abbildung 27 A). Eine Clr-a Fusionsproteinvariante mit einem Clr-f stalk-Bereich

wurde ebenfalls produziert. Die Clr-a Fc Fusionsproteine lagen in glykosylierter Form vor (Abbildung 27 B+C). Die Fc Fusionsproteine waren funktionell, was zumindest anhand der Kontrollproteine Clr-f Fc und KACL-Fc durch Bindung an dessen ektope und/oder endogene exprimierte Rezeptoren Maus Nkrp1g beziehungsweise das humane NKp65 in der Durchflusszytometrie gezeigt wurde (Abbildung 28). Sowohl in der Kokultur mit den BWN-Reporterzellen (Daten nicht gezeigt), als auch durch durchflusszytometrische Analyse mit den Fc Fusionsproteinen wurde eine Reihe an humanen und murinen Zelllinien nach einem Clr-a Rezeptor gescreent. Dabei lieferten sowohl diverse T-Zelllinien als auch Tumorzelllinien sowie Fibroblasten keine Evidenz für einen Clr-a Rezeptor (Abbildung 29). Die starke Bindung der Clr-f Fc Fusionskontrollproteine auf diversen nicht Nkrp1g tragenden Zelllinien ist sehr wahrscheinlich unspezifisch und könnte durch eine Aggregatbildung multipler Fc Fusionsproteine erklärt werden. Da durch Färbungen mit dem Clr-a Fc und den Clr-f_Clr-a Fc Fusionsproteinen keine eindeutige Bindung an einen potenziellen Rezeptor beobachtet wurde, wurde die Positivkontrolle Clr-f Fc, die zumal ebenso eine eindeutige Färbung an dessen Rezeptor Nkrp1g aufzeigte (Abbildung 29), nicht weiter analysiert.

Die Ergebnisse der gesamten Interaktionsstudien lassen zu dem Schluß kommen, dass die analysierten Proben keinen Rezeptor für Clr-a besitzen. Jedoch ist es ebenso möglich, dass der Clr-a Rezeptor auf einer sehr seltenen Zellpopulation exprimiert wird und die eingesetzten Reporterassays sowie die durchflusszytometrische Analyse mit den Fc-Fusionsproteinen in einem Sensitivitätsbereich liegen, die einen Nachweis dieser Zellen ausschließen. Zudem kann es sein, dass der Rezeptor unter normalen Bedingungen nicht oder nur sehr schwach auf der Zelloberfläche präsent ist und dessen Expression erst nach Stimulation in einem inflammatorischen Umfeld induziert wird. So ist das im humanen NKC-kodierte Protein AICL (engl. activation induced C-type lectin) in ruhenden NK-Zellen im Golgi-Komplex lokalisiert und wird erst nach Stimulation mit inflammatorischen Cytokinen an die Zelloberfläche exportiert, um mit dessen Rezeptor NKp80 zu interagieren. Durch die NKp80-AICL Achse wird eine autonome Kontrolle der humanen NK-Zellantwort gewährleistet (Klimosch et al., 2013). Eine Aktivierungs-induzierte Oberflächenexpression ist auch für die humanen CLEC2 Mitglieder CD69 und LLT1 beschrieben, die ebenso an der Regulation von Immunantworten beteiligt sind (Klimosch et al., 2013). CD69 wird als sehr früher Aktivierungsmarker auf aktivierten Lymphozyten beschrieben und ist an der Kontrolle der T-Zelldifferenzierung und der T-Zell Migration und Retention in Geweben beteiligt (Cibrián & Sánchez-Madrid, 2017). Die CD69 Expression auf der Oberfläche von T Lymphozyten wird schnell nach TCR/CD3 Bindung, durch aktivierende Cytokine und polyklonale mitogene Stimulation induziert (Cibrián & Sánchez-Madrid, 2017). Daher wurden Maus IECs und IELs nach Induktion einer intestinalen Entzündung nach Verabreichung von Poly(I:C) im Vergleich zu PBS auf das Vorhandensein eines eventuell hochregulierten Clr-a Rezeptors hin überprüft. Eine im Vergleich zur unspezifischen Hintergrundfärbung der Fc-Fusionsproteine auf den primären Zellen verstärkte Bindung an einen

möglichen Rezeptor konnte jedoch nicht beobachtet werden (Abbildung 30). Die in dieser Arbeit verwendeten Ansätze decken aufgrund der direkt gewählten Populationsauswahl nur einen kleinen Teil der in Frage kommenden Proteine und Zellpopulationen ab. Perspektivisch ist in weiteren Studien ein weitumfassendes Screening-Experiment unter Verwendung einer cDNA-Bibliothek, welches eine Vielzahl an intestinalen Mausproteinen abdeckt, sinnvoll.

5.5 Heterodimerisierung von Clr-a und Clr-f

Eine weitere Ursache für die erfolglose Suche eines Clr-a Rezeptors könnte an der Abwesenheit eines möglichen Clr-a Kofaktors/Adapterproteins liegen, welches für eine funktionelle Interaktion mit einem potenziellen Rezeptor notwendig ist. Aufgrund der selektiven und parallelen Expression der beiden Clr Moleküle Clr-a und Clr-f in intestinalen Epithelzellen, wäre die Expression eines Clr-a/Clr-f Heterodimers denkbar. Innerhalb des NKC ist die Heterodimerisierung von bestimmten Rezeptoren in Mensch und Maus beschrieben. Im Menschen werden zum Beispiel bis auf den aktivierenden NK-Zellrezeptor NKG2D, der als Homodimer exprimiert wird, bestimmte Isoformen von NKG2 Rezeptoren als Heterodimer mit CD94 exprimiert und fungieren je nach Isoform als aktivierende oder inhibierende NK-Zellrezeptoren (Brooks, Posch, Scorzelli, Borrego, & Coligan, 1997; Gunturi, Berg, & Forman, 2004; Orbelyan et al., 2014). Zur Untersuchung einer möglichen Heterodimerbildung wurde eine indirekte Herangehensweise gewählt, indem nach ektopter Koexpression von Clr-a und Clr-f eine mögliche Modifizierung der funktionellen Interaktion zwischen Clr-f und dessen Rezeptor Nkrp1g und somit eine potenzielle Funktionsregulation adressiert wurde. Jedoch waren in Kokulturen von Nkrp1g tragenden eGFP Reporterzellen mit Clr-a/Clr-f koexprimierenden 293T Zellen keine signifikanten Unterschiede der Reporterzellantwort nach Überexpression von Clr-a und Clr-f im Vergleich zur mock/Clr-f Kontrolle (Abbildung 31 A+B) ersichtlich. Zudem hatte die Koexpression von Clr-a keinen Einfluss auf die Inhibition der NK-Zellfunktion. Die Degranulation von Nkrp1g exprimierenden NK-92MI Zellen nach Interaktion mit Clr-a/Clr-f tragenden COS7 Zellen zeigte im CD107a Degranulationsassay nur eine geringe, jedoch nicht signifikante Zunahme der NK-92MI Degranulation (Abbildung 31 C+D). Insgesamt sprechen diese Ergebnisse gegen eine Komplexbildung zwischen Clr-a und Clr-f. Unterstützt wurde dieses Erkenntnis durch Koimmunpräzitationsstudien von Clr-a und Clr-f aus Dünndarm- und Kolon-Zelllysaten. Nach einer Präzipitation von Clr-f (Abbildung 33, unten) ist im Immunoblot mit dem Clr-a spezifischen Antikörper 2E3 (Abbildung 33, oben; Abschnitt 2) nur eine sehr schwache Bande detektierbar, die eine leicht höhere molekulare Masse aufweist als in der Dünndarm Input-Kontrolle. Ob es sich bei dem präzipitierten Protein um Clr-a handelt, könnte zukünftig in einer massenspektrometrischen Analyse untersucht werden. Bei einer bestehenden Heterodimerbildung wären bei diesen großen Mengen an präzipitierten Clr-f jedoch weitaus mehr Clr-a Protein zu erwarten.

Eine weitere Evidenz gegen eine Heterodimerbildung zwischen Clr-a und Clr-f unter physiologischen Bedingungen liefern Immunfluoreszenzaufnahmen von Clr-f defizienten Mäusen (Abbildung 34 A-C). Trotz einer fehlenden Expression von Clr-f im intestinalen Epithel, ist Clr-a dennoch im Darm vorhanden. Im Zusammenhang mit den Koexpressionsstudien wurde ebenso untersucht, ob Clr-a/Clr-f Heterodimere als Interaktionspartner für einen im NKC-kodierten Nkrp1 Rezeptor fungieren. Hierfür wurden Nkrp1a/-c/-d/-f und -g exprimierende stabile eGFP Reporterzellen generiert (Abbildung 32 A), die die Hybridrezeptoren stark auf der Zelloberfläche präsentierten (Abbildung 32 C). Die Reporterzellen waren funktionell, da sie sich mit einem gegen den FLAG-Tag gerichteten Antikörper stimulieren ließen (Abbildung 32 B). Eine Bindung an Clr-a/Clr-f koexprimierende 293T Zellen wurde jedoch nicht beobachtet (Abbildung 32 E). Eine mögliche Heterodimerisierung innerhalb der Clr Familie wurde ebenfalls für Clr-b diskutiert (Chen et al., 2015b; Iizuka et al., 2003). Es wird ein Modell besprochen, bei welchem Clr-b die Oberflächenexpression von anderen Clr-Liganden modulieren könnte. Unter normalen Bedingungen könnte Clr-b sowohl Homodimere ausbilden, die NK-Zellen via Nkrp1-b inhibieren, als auch Heterodimere mit anderen Clr Molekülen, die nicht erkannt werden. Der Verlust von Clr-b im Falle einer Infektion, Stress oder Transformation könnte sowohl die „missing-self“ Erkennung der Clr-b Homodimere fördern als auch die „induced self“ Erkennung anderer Clrs, z. B. der Clr-c, Clr-d oder Clr-g Dimere fördern (Chen et al., 2015b). Die Ergebnisse in diesem Abschnitt sprechen insgesamt gegen eine Heterodimerisierung von Clr-a und Clr-f. Diese Erkenntnisse werden unterstützt durch die entgegengesteuerte Expressionsregulation beider Moleküle im Darm unter inflammatorischen Bedingungen, welche im folgenden Abschnitt diskutiert wird.

5.6 TLR3-vermittelte Expressionsmodulation von Clr-a

Innerhalb der Clr Familie ist Clr-b das am besten charakterisierte Clr Molekül. Studien zeigen die Bedeutung einer Clr-b Expressionregulation im Kontext einer zellulären Immunüberwachung durch cytotoxische Lymphozyten (Chen et al., 2015a; K. J. N. Williams et al., 2012). Es wird beschrieben, dass die Herabregulierung der Clr-b Expression ein nicht-redundantes MHC-unabhängiges „missing self“-Erkennungssystem repräsentiert (Carlyle et al., 2004; Chen et al., 2015b). In Bezug auf Clr-a zeigen Ergebnisse dieser Arbeit eine schnelle und nahezu vollständige Herabmodulierung der Clr-a Expression auf Transkript- und Proteinebene im intestinalen Epithel nach Behandlung von Mäusen mit dem immunstimulierenden Adjuvans Poly(I:C) (Abbildung 35 B-D). Interessanterweise geht diese drastische Expressionsreduzierung von Clr-a in einem inflammatorischen Umfeld mit einer Heraufregulierung der Clr-f Expression einher (Leibelt et al., 2014). Die Heraufregulierung von Clr-f bewirkt möglicherweise eine Kontrolle oder Minderung der Funktionen der IEL Effektorpopulation durch Bindung an den inhibierenden Rezeptor Nkrp1g auf den IELs (Leibelt et al., 2014). Diese

gegengesteuerte Regulation der am nächsten Verwandten Moleküle Clr-a und Clr-f als Antwort auf eine immunstimulierende Komponente deutet auf einen entgegenwirkenden Mechanismus dieser beiden Moleküle bei der Immunüberwachung des Darmes hin. Es ist denkbar, dass die schnelle Herabregulierung von Clr-a bei entzündlichen Vorgängen im Darm einer Regulierung im Sinne einer Reduzierung der intestinalen Immunantwort dient.

Die Herabregulierung der Clr-a Expression findet sowohl auf transkriptioneller als auch auf Proteinebene statt. Somit sind bei der Clr-a Expression nicht nur transkriptionelle Regulation, sondern auch post-transkriptionelle und/oder translationale Mechanismen involviert. Die post-transkriptionelle Regulation wird in Säugerzellen unter anderem durch die 3'UTR kontrolliert, die die Stabilität, Lokalisierung, Translation sowie Degradation der mRNA bestimmt (Matoulkova, Michalova, Vojtesek, & Hrstka, 2012). Bemerkenswerterweise wurden für zwei Gene der NKC-kodierten CLEC2 Familie, *Clec2e* und *Clec2d*, kodierend für Clr-a und Clr-b, hochaktive diskontinuierliche Hammerkopf (engl. hammerhead) Ribozyme in der 3'UTR identifiziert (Martick et al., 2008). Die Strukturen der hammerhead Ribozyme sind in Säugetieren bislang nur selten beschrieben. Ihre Funktion beinhaltet das autonome Zuschneiden der 3'UTR in vitro und in vivo in ihre funktionsfähige mRNA Form. Dies resultiert in einer reduzierten Proteinexpression. Die Ergebnisse (Martick et al., 2008) zeigten jedoch, dass die *Clec2e* 3'UTR in einem geringeren Ausmaß gespalten wurde als *Clec2d*. Erklärt wird dies durch eventuelle Faltungsschwierigkeiten aufgrund einer etwa 450 Nukleotide längeren Sequenz in einem bestimmten Abschnitt des Ribozyms im Vergleich zu *Clec2d* sowie einer schwächeren Sekundärstrukturausbildung (Martick et al., 2008). Dieser seltene post-transkriptionelle Regulationsmechanismus der Gene *Clec2e* und *Clec2d* deutet auf die Notwendigkeit einer streng regulierten Expressionskontrolle dieser C-Typ Lektin-ähnlichen Proteine hin.

Die Poly(I:C) vermittelte Expressionsregulation wird über TLR3 vermittelt. Dies konnte anhand von Echtzeit-PCR Analysen und Immunfluoreszenzfärbungen von Dünndarmgewebeschnitten in TLR3-defizienten Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen gezeigt werden (Abbildung 36). Nach Induktion der TLR3 Signalkaskade wird die Produktion der Typ I Interferone IFN α und IFN β sowie IFN γ induziert. Zudem werden diverse proinflammatorische Cytokine wie IL-6, IL-10, IL-12 und TNF α ausgeschüttet. Inwiefern weitere Immunzellmediatoren, die durch diese Signalaktivierung induziert werden auf die Clr-a Expression einen Einfluss haben, wurde im Rahmen dieser Arbeit in vorläufigen Versuchen unter Verwendung von intestinalen Organoidkulturen überprüft (Abbildung 37). Die Analyse der *Clec2e* Transkriptmenge in Organoiden nach Stimulation mit TNF α , IL-22, IFN β und IFN γ ergab jedoch keine ersichtlichen Veränderungen der relativen Kopienzahl. Es ist möglich, dass eine Expressionsmodulation auf Proteinebene stattfindet, diese jedoch nicht in der Transkriptmenge ersichtlich ist. Verschiedene Knockout-Mausmodelle, die in der Produktion verschiedener Cytokine defizient sind, könnten in

zukünftigen Studien einen weiteren Einblick in die funktionelle Regulierung der Clr-a Expression ermöglichen.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse charakterisieren erstmalig das im NKC kodierte C-Typ Lektin-ähnliche Molekül Clr-a in der Maus. Clr-a weist eine starke Gewebespezifität auf und wird ausschließlich im Gastrointestinaltrakt vorwiegend im Dünndarm und im Kolon der Maus exprimiert. Die konstitutive Expression sowohl in den differenzierten Epithelzellen als auch in Zellen der Stammzellnische in Verbindung mit einer starken Expressionsmodulation unter inflammatorischen Bedingungen deutet darauf hin, dass Clr-a bei der Immunüberwachung des Darmes beteiligt ist. Insgesamt konnten anhand dieser Ergebnisse neue Einblicke in die Familie der CLEC2 Proteine gewonnen werden.

Literaturverzeichnis

- Abreu, M. T. (2010). Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nature Reviews Immunology*, 10(2), 131–144. <http://doi.org/10.1038/nri2707>
- Aguilar, O. A., Berry, R., Rahim, M. M. A., Reichel, J. J., Popović, B., Tanaka, M., ... Carlyle, J. R. (2017). A Viral Immune-evasion Controls Innate Immunity by Targeting the Prototypical Natural Killer Cell Receptor Family. *Cell*, 169(1), 58–71.e14. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2017.03.002>
- Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. (2006). Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell*, 124(4), 783–801. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.015>
- Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R., & Flavell, R. A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3. *Nature*, 413(6857), 732–738. <http://doi.org/10.1038/35099560>
- Allez, M., Tieng, V., Nakazawa, A., Treton, X., Pacault, V., Dulphy, N., ... Toubert, A. (2007). CD4+NKG2D+ T Cells in Crohn's Disease Mediate Inflammatory and Cytotoxic Responses Through MICA Interactions. *Gastroenterology*, 132(7), 2346–2358. <http://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.03.025>
- Alter, G., Malenfant, J. M., & Altfeld, M. (2004). CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *Journal of Immunological Methods*, 294(1–2), 15–22. <http://doi.org/10.1016/j.jim.2004.08.008>
- Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J., & Schwede, T. (2006). The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*, 22(2), 195–201. <http://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti770>
- Barker, N. (2014). Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 15(1), 19–33. <http://doi.org/10.1038/nrm3721>
- Barker, N., van de Wetering, M., & Clevers, H. (2008). The intestinal stem cell. *Genes & Development*, 22(14), 1856–64. <http://doi.org/10.1101/gad.1674008>
- Barker, N., van Es, J. H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M., Cozijnsen, M., ... Clevers, H. (2007). Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature*, 449(7165), 1003–7. <http://doi.org/10.1038/nature06196>
- Barlow, D. J., Edwards, M. S., & Thornton, J. M. (1986). Continuous and discontinuous protein

-
- antigenic determinants. *Nature*, 322(6081), 747–748. <http://doi.org/10.1038/322747a0>
- Bartel, Y., Bauer, B., & Steinle, A. (2013). Modulation of NK cell function by genetically coupled C-type lectin-like receptor/ligand pairs encoded in the human natural killer gene complex. *Frontiers in Immunology*, 4, 362. <http://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00362>
- Bauer, B., Spreu, J., Rohe, C., Vogler, I., & Steinle, A. (2015). Key residues at the membrane-distal surface of KACL, but not glycosylation, determine the functional interaction of the keratinocyte-specific C-type lectin-like receptor KACL with its high-affinity receptor NKp65. *Immunology*, 145(1), 114–123. <http://doi.org/10.1111/imm.12432>
- Bauer, B., Wotapek, T., Zöller, T., Rutkowski, E., & Steinle, A. (2017). The Activating C-type Lectin-like Receptor NKp65 Signals through a Hemi-immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif (hemITAM) and Spleen Tyrosine Kinase (Syk). *The Journal of Biological Chemistry*, 292(8), 3213–3223. <http://doi.org/10.1074/jbc.M116.759977>
- Bevins, C. L., & Salzman, N. H. (2011). Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nature Reviews Microbiology*, 9(5), 356–368. <http://doi.org/10.1038/nrmicro2546>
- Bjerknes, M., & Cheng, H. (1981). The stem-cell zone of the small intestinal epithelium. I. Evidence from Paneth cells in the adult mouse. *The American Journal of Anatomy*, 160(1), 51–63. <http://doi.org/10.1002/aja.1001600105>
- Brandtzaeg, P., & Prydz, H. (1984). Direct evidence for an integrated function of J chain and secretory component in epithelial transport of immunoglobulins. *Nature*, 311(5981), 71–73. <http://doi.org/10.1038/311071a0>
- Brooks, A. G., Posch, P. E., Scorzelli, C. J., Borrego, F., & Coligan, J. E. (1997). NKG2A complexed with CD94 defines a novel inhibitory natural killer cell receptor. *The Journal of Experimental Medicine*, 185(4), 795–800. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9034158>
- Brown, M. G., & Scalzo, A. A. (n.d.). NK gene complex dynamics and selection for NK cell receptors. <http://doi.org/10.1016/j.smim.2008.06.004>
- Buczacki, S. J. A., Zecchini, H. I., Nicholson, A. M., Russell, R., Vermeulen, L., Kemp, R., & Winton, D. J. (2013). Intestinal label-retaining cells are secretory precursors expressing Lgr5. *Nature*, 495(7439), 65–9. <http://doi.org/10.1038/nature11965>
- Cameron, J. S., Alexopoulou, L., Sloane, J. A., DiBernardo, A. B., Ma, Y., Kosaras, B., ... Vartanian, T. (2007). Toll-Like Receptor 3 Is a Potent Negative Regulator of Axonal Growth in Mammals. *Journal of Neuroscience*, 27(47), 13033–13041. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4290->

- Cario, E., & Podolsky, D. K. (2000). Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infection and Immunity*, 68(12), 7010–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11083826>
- Carlyle, J. R., Jamieson, A. M., Gasser, S., Clingan, C. S., Arase, H., & Raulet, D. H. (2004). Missing self-recognition of Ocil/Clr-b by inhibitory NKR-P1 natural killer cell receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(10), 3527–32. <http://doi.org/10.1073/pnas.0308304101>
- Carlyle, J. R., Mesci, A., Fine, J. H., Chen, P., Bélanger, S., Tai, L.-H., & Makrigiannis, A. P. (2008). Evolution of the Ly49 and Nkrp1 recognition systems. *Seminars in Immunology*, 20(6), 321–330. <http://doi.org/10.1016/j.smim.2008.05.004>
- Carmon, K. S., Gong, X., Lin, Q., Thomas, A., & Liu, Q. (2011). R-spondins function as ligands of the orphan receptors LGR4 and LGR5 to regulate Wnt/beta-catenin signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(28), 11452–7. <http://doi.org/10.1073/pnas.1106083108>
- Castaño-Rodríguez, N., Kaakoush, N. O., & Mitchell, H. M. (2014). Pattern-recognition receptors and gastric cancer. *Frontiers in Immunology*, 5(JUL), 1–23. <http://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00336>
- Chen, P., Aguilar, O. A., Rahim, M. M. A., Allan, D. S. J., Fine, J. H., Kirkham, C. L., ... Carlyle, J. R. (2015a). Genetic investigation of MHC-independent missing-self recognition by mouse NK cells using an in vivo bone marrow transplantation model. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 194(6), 2909–18. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.1401523>
- Chen, P., Aguilar, O. A., Rahim, M. M. A., Allan, D. S. J., Fine, J. H., Kirkham, C. L., ... Carlyle, J. R. (2015b). Genetic Investigation of MHC-Independent Missing-Self Recognition by Mouse NK Cells Using an In Vivo Bone Marrow Transplantation Model. *The Journal of Immunology*, 194(6), 2909–2918. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.1401523>
- Chen, P., Bélanger, S., Aguilar, O. A., Zhang, Q., St.-Laurent, A., Rahim, M. M. A., ... Carlyle, J. R. (2011). Analysis of the mouse 129-strain Nkrp1-Clr gene cluster reveals conservation of genomic organization and functional receptor–ligand interactions despite significant allelic polymorphism. *Immunogenetics*, 63(10), 627–640. <http://doi.org/10.1007/s00251-011-0542-8>
- Cheng, H., & Leblond, C. P. (1974). Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine V. Unitarian theory of the origin of the four epithelial cell

- types. *American Journal of Anatomy*, 141(4), 537–561. <http://doi.org/10.1002/aja.1001410407>
- Cheroutre, H., Lambolez, F., & Mucida, D. (2011). The light and dark sides of intestinal intraepithelial lymphocytes. *Nature Reviews. Immunology*, 11(7), 445–56. <http://doi.org/10.1038/nri3007>
- Cibrián, D., & Sánchez-Madrid, F. (2017). CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper. *European Journal of Immunology*, 47(6), 946–953. <http://doi.org/10.1002/eji.201646837>
- Claes, A.-K., Zhou, J. Y., & Philpott, D. J. (2015). NOD-Like Receptors: Guardians of Intestinal Mucosal Barriers. *Physiology*, 30(3), 241–250. <http://doi.org/10.1152/physiol.00025.2014>
- Clevers, H. C., & Bevins, C. L. (2013). Paneth cells: maestros of the small intestinal crypts. *Annual Review of Physiology*, 75, 289–311. <http://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183744>
- Comelli, E. M., Simmering, R., Faure, M., Donnicola, D., Mansourian, R., Rochat, F., ... Cherbut, C. (2008). Multifaceted transcriptional regulation of the murine intestinal mucus layer by endogenous microbiota. *Genomics*, 91(1), 70–7. <http://doi.org/10.1016/j.ygeno.2007.09.006>
- Corthésy, B. (2013). Multi-faceted functions of secretory IgA at mucosal surfaces. *Frontiers in Immunology*, 4(185), 1–11. <http://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00185>
- Crosnier, C., Stamatakis, D., & Lewis, J. (2006). Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nature Reviews. Genetics*, 7(5), 349–359. <http://doi.org/10.1038/nrg1840>
- David B. Rosen, Jayaram Bettadapura, Mohammed Alsharifi, Porunelloor A. Mathew, H. S. W. and L. L. L. (2005). Lectin-Like Transcript-1 Is a Ligand for the Inhibitory Human NKR-P1A Receptor. *The Journal of Immunology*, 175, 7796–7799. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.175.12.7796>
- Denning, T. L., Granger, S. W., Granger, S., Mucida, D., Graddy, R., Leclercq, G., ... Kronenberg, M. (2007). Mouse TCR α beta+CD8 α intraepithelial lymphocytes express genes that down-regulate their antigen reactivity and suppress immune responses. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 178(7), 4230–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17371979>
- Dixit, E., & Kagan, J. C. (2013). Intracellular pathogen detection by RIG-I-like receptors. *Advances in Immunology*, 117, 99–125. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-410524-9.00004-9>
- Estornes, Y., Toscano, F., Virard, F., Jacquemin, G., Pierrot, A., Vanbervliet, B., ... Lebecque, S. (2012). dsRNA induces apoptosis through an atypical death complex associating TLR3 to caspase-8. *Cell Death & Differentiation*, 19(9), 1482–1494. <http://doi.org/10.1038/cdd.2012.22>
- Farin, H. F., Van Es, J. H., & Clevers, H. (2012). Redundant Sources of Wnt Regulate Intestinal Stem

-
- Cells and Promote Formation of Paneth Cells. *Gastroenterology*, 143(6), 1518–1529.e7.
<http://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.08.031>
- Farquhar, M. G., & Palade, G. E. (1963). Junctional complexes in various epithelia. *The Journal of Cell Biology*, 17, 375–412. Retrieved from
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2106201/pdf/375.pdf>
- Fine, J. H., Chen, P., Mesci, A., Allan, D. S. J., Gasser, S., Raulet, D. H., & Carlyle, J. R. (2010). Chemotherapy-Induced Genotoxic Stress Promotes Sensitivity to Natural Killer Cell Cytotoxicity by Enabling Missing-Self Recognition. *Cancer Research*, 70(18), 7102–7113.
<http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1316>
- Flornes, L. M., Nylenna, Ø., Saether, P. C., Daws, M. R., Dissen, E., & Fossum, S. (2010). The complete inventory of receptors encoded by the rat natural killer cell gene complex. *Immunogenetics*, 62(8), 521–30. <http://doi.org/10.1007/s00251-010-0455-y>
- Freeze, H. H., & Kranz, C. (2010). Endoglycosidase and glycoamidase release of N-linked glycans. *Current Protocols in Molecular Biology*, Chapter 17, Unit 17.13A.
<http://doi.org/10.1002/0471142727.mb1713as89>
- Freund, J. (1947). Some Aspects of Active Immunization. *Annual Review of Microbiology*, 1(1), 291–308. <http://doi.org/10.1146/annurev.mi.01.100147.001451>
- FREUND, J. (1956). The mode of action of immunologic adjuvants. *Bibliotheca Tuberculosea*, (10), 130–48. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13341884>
- Freund, J., & McDermott, K. (1942). Sensitization to Horse Serum by Means of Adjuvants. *Experimental Biology and Medicine*, 49(4), 548–553. <http://doi.org/10.3181/00379727-49-13625>
- Fukata, M., Chen, A., Vamadevan, A. S., Cohen, J., Breglio, K., Krishnareddy, S., ... Abreu, M. T. (2007). Toll-Like Receptor-4 Promotes the Development of Colitis-Associated Colorectal Tumors. *Gastroenterology*, 133(6), 1869–1869.e14. <http://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.09.008>
- Garrod, D., & Chidgey, M. (2007). Desmosome structure, composition and function. *Biochimica et Biophysica Acta* 1778, 572–587. <http://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.07.014>
- Gerbe, F., Legraverend, C., & Jay, P. (2012). The intestinal epithelium tuft cells: specification and function. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 69(17), 2907–17.
<http://doi.org/10.1007/s00018-012-0984-7>
- Gilmore, A. P. (2005). Anoikis. *Cell Death and Differentiation*, 12 Suppl 2(S2), 1473–7.
<http://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401723>
-

-
- Groh, V., Bahram, S., Bauer, S., Herman, A., Beauchamp, M., & Spies, T. (1996). Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(22), 12445–50. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8901601>
- Guan, Y., Watson, A. J. M., Marchiando, A. M., Bradford, E., Shen, L., Turner, J. R., & Montrose, M. H. (2011). Redistribution of the tight junction protein ZO-1 during physiological shedding of mouse intestinal epithelial cells. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 300(6), C1404-14. <http://doi.org/10.1152/ajpcell.00270.2010>
- Guex, N., Peitsch, M. C., & Schwede, T. (2009). Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: A historical perspective. *ELECTROPHORESIS*, 30(S1), S162–S173. <http://doi.org/10.1002/elps.200900140>
- Gum, J. R., Hicks, J. W., Toribara, N. W., Siddiki, B., & Kim, Y. S. (1994). Molecular cloning of human intestinal mucin (MUC2) cDNA. Identification of the amino terminus and overall sequence similarity to prepro-von Willebrand factor. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(4), 2440–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8300571>
- Gunturi, A., Berg, R. E., & Forman, J. (2004). The Role of CD94/NKG2 in Innate and Adaptive Immunity. *Immunologic Research*, 30(1), 029–034. <http://doi.org/10.1385/IR:30:1:029>
- Guy-Grand, D., Cerf-Bensussan, N., Malissen, B., Malassis-Seris, M., Briottet, C., & Vassalli, P. (1991). Two gut intraepithelial CD8+ lymphocyte populations with different T cell receptors: a role for the gut epithelium in T cell differentiation. *The Journal of Experimental Medicine*, 173(2), 471–81. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1824857>
- Hao, L., Klein, J., & Nei, M. (2006). Heterogeneous but conserved natural killer receptor gene complexes in four major orders of mammals. Retrieved from www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0511280103
- Hartmann, J., Tran, T.-V., Kaudeer, J., Oberle, K., Herrmann, J., Quagliano, I., ... Koch, J. (2012). The Stalk Domain and the Glycosylation Status of the Activating Natural Killer Cell Receptor NKp30 Are Important for Ligand Binding * □ S. <http://doi.org/10.1074/jbc.M111.304238>
- Hatice Aldemir, Virginie Prod'homme, M.-J., & Dumaourier, Christelle Retiere, Gwenola Poupon, Julie Cazareth, F. B. and V. M. B. (2005). Lectin-Like Transcript 1 Is a Ligand for the CD161 Receptor. *The Journal of Immunology*, 175, 7791–7795. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.175.12.7791>
- Heukeshoven, J., & Dernick, R. (1988). Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis*, 9(1),

-
- 28–32. <http://doi.org/10.1002/elps.1150090106>
- Hilpert, K., Winkler, D. F., & Hancock, R. E. (2007). Peptide arrays on cellulose support: SPOT synthesis, a time and cost efficient method for synthesis of large numbers of peptides in a parallel and addressable fashion. *Nature Protocols*, 2(6), 1333–1349. <http://doi.org/10.1038/nprot.2007.160>
- Hollingsworth, M. A., & Swanson, B. J. (2004). Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. *Nature Reviews. Cancer*, 4(1), 45–60. <http://doi.org/10.1038/nrc1251>
- Honda, K., Sakaguchi, S., Nakajima, C., Watanabe, A., Yanai, H., Matsumoto, M., ... Taniguchi, T. (2003). *Selective contribution of IFN-signaling to the maturation of dendritic cells induced by double-stranded RNA or viral infection*. Retrieved from www.pnas.org
- Huang, Y., Park, Y., Wang-Zhu, Y., Larange, A., Arens, R., Bernardo, I., ... Cheroutre, H. (2011). Mucosal memory CD8+ T cells are selected in the periphery by an MHC class I molecule. *Nature Immunology*, 12(11), 1086–1095. <http://doi.org/10.1038/ni.2106>
- Hugot, J.-P., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cézard, J.-P., Belaiche, J., ... Thomas, G. (2001). Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*, 411(6837), 599–603. <http://doi.org/10.1038/35079107>
- Iizuka, K., Naidenko, O. V., Plougastel, B. F. M., Fremont, D. H., & Yokoyama, W. M. (2003). Genetically linked C-type lectin-related ligands for the NKRP1 family of natural killer cell receptors. *Nature Immunology*, 4(8), 801–807. <http://doi.org/10.1038/ni954>
- Ito, Y., Kanai, T., Totsuka, T., Okamoto, R., Tsuchiya, K., Nemoto, Y., ... Blockade, W. M. (2008). Blockade of NKG2D signaling prevents the development of murine CD4 T cell-mediated colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 294, 199–207. <http://doi.org/10.1152/ajpgi.00286.2007>
- Johansson, M. E. V, Ambort, D., Pelaseyed, T., Schütte, A., Gustafsson, J. K., Ermund, A., ... Hansson, G. C. (2011). Composition and functional role of the mucus layers in the intestine. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 68(22), 3635–41. <http://doi.org/10.1007/s00018-011-0822-3>
- Johansson, M. E. V, Larsson, J. M. H., & Hansson, G. C. (2011). The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108 Suppl, 4659–65. <http://doi.org/10.1073/pnas.1006451107>
- Johansson, M. E. V, Phillipson, M., Petersson, J., Velcich, A., Holm, L., & Hansson, G. C. (2008). The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(39),

-
- 15064–9. <http://doi.org/10.1073/pnas.0803124105>
- Johansson, M. E. V, Sjövall, H., & Hansson, G. C. (2013). The gastrointestinal mucus system in health and disease. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 10(6), 352–61. <http://doi.org/10.1038/nrgastro.2013.35>
- Joshi Aditya D., P. A. M. (2006). Role of Conserved Prolines in the Structure and Function of the Na⁺/Dicarboxylate Cotransporter 1, NaDC1⁺. *Biochemistry*, 45(13), 4231–4239. <http://doi.org/10.1021/BI052064Y>
- Kakimoto, K., Takekoshi, S., Miyajima, K., & Osamura, R. Y. (2008). Hypothesis for the mechanism for heat-induced antigen retrieval occurring on fresh frozen sections without formalin-fixation in immunohistochemistry. *Journal of Molecular Histology*, 39(4), 389–399. <http://doi.org/10.1007/s10735-008-9177-y>
- Kang, D. -c., Gopalkrishnan, R. V., Wu, Q., Jankowsky, E., Pyle, A. M., & Fisher, P. B. (2002). mda-5: An interferon-inducible putative RNA helicase with double-stranded RNA-dependent ATPase activity and melanoma growth-suppressive properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(2), 637–642. <http://doi.org/10.1073/pnas.022637199>
- Kayser, F. H., Böttger, E. C., Deplazes, P., Haller, O., & Roers, A. (2014). *Taschenlehrbuch Medizinische Mikrobiologie* (13. Auflag). Thieme.
- Kelley, J., Walter, L., & Trowsdale, J. (2005). Comparative genomics of natural killer cell receptor gene clusters. *PLoS Genetics*, 1(2), 129–39. <http://doi.org/10.1371/journal.pgen.0010027>
- Kirkham, C. L., & Carlyle, J. R. (2014). Complexity and Diversity of the NKR-P1:Clr (Klrb1:Clec2) Recognition Systems. *Frontiers in Immunology*, 5, 214. <http://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00214>
- Klimosch, S. N., Bartel, Y., Wiemann, S., & Steinle, A. (2013). Genetically coupled receptor-ligand pair NKp80-AICL enables autonomous control of human NK cell responses. *Blood*, 122(14), 2380–9. <http://doi.org/10.1182/blood-2013-01-479790>
- Köhler, G., & Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256(5517), 495–497. <http://doi.org/10.1038/256495a0>
- Kuhnert, F., Davis, C. R., Wang, H.-T., Chu, P., Lee, M., Yuan, J., ... Kuo, C. J. (2004). Essential requirement for Wnt signaling in proliferation of adult small intestine and colon revealed by adenoviral expression of Dickkopf-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(1), 266–71. <http://doi.org/10.1073/pnas.2536800100>
- Kveberg, L., Dai, K.-Z., Inngjerdingen, M., Brooks, C. G., Fossum, S., & Vaage, J. T. (2011). Phylogenetic

-
- and functional conservation of the NKR-P1F and NKR-P1G receptors in rat and mouse. *Immunogenetics*, 63(7), 429–436. <http://doi.org/10.1007/s00251-011-0520-1>
- Lacroix-Lamandé, S., Guesdon, W., Drouet, F., Potiron, L., Lantier, L., & Laurent, F. (2014). The gut flora is required for the control of intestinal infection by poly(I:C) administration in neonates. *Gut Microbes*, 5(4), 533–540. <http://doi.org/10.4161/gmic.29154>
- Lathia, J. D., Okun, E., Tang, S.-C., Griffioen, K., Cheng, A., Mughal, M. R., ... Mattson, M. P. (2008). Toll-Like Receptor 3 Is a Negative Regulator of Embryonic Neural Progenitor Cell Proliferation. *Journal of Neuroscience*, 28(51), 13978–13984. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2140-08.2008>
- Leibelt, S., Friede, M. E., Rohe, C., Gütle, D., Rutkowski, E., Weigert, a, ... Steinle, a. (2014). Dedicated immunosensing of the mouse intestinal epithelium facilitated by a pair of genetically coupled lectin-like receptors. *Mucosal Immunology*, (July), 2–12. <http://doi.org/10.1038/mi.2014.60>
- Li, Y., Wang, Q., Chen, S., Brown, P. H., & Mariuzza, R. A. (2013). Structure of NKp65 bound to its keratinocyte ligand reveals basis for genetically linked recognition in natural killer gene complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(28), 11505–11510. <http://doi.org/10.1073/pnas.1303300110>
- Li, Z., Zhang, C., Zhou, Z., Zhang, J., Zhang, J., & Tian, Z. (2012). Small intestinal intraepithelial lymphocytes expressing CD8 and T cell receptor ??? are involved in bacterial clearance during salmonella enterica serovar typhimurium infection. *Infection and Immunity*, 80(2), 565–574. <http://doi.org/10.1128/IAI.05078-11>
- Llera, A. S., Viedma, F., Sánchez-Madrid, F., & Tormo, J. (2001). Crystal Structure of the C-type Lectin-like Domain from the Human Hematopoietic Cell Receptor CD69. *Journal of Biological Chemistry*, 276(10), 7312–7319. <http://doi.org/10.1074/jbc.M008573200>
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D., & Darnell, J. (2000). *Molecular cell biology* (4th ed.). New York: W.H. Freeman.
- López-Llano, J., Campos, L. A., & Sancho, J. (2006). α -helix stabilization by alanine relative to glycine: Roles of polar and apolar solvent exposures and of backbone entropy. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 64(3), 769–778. <http://doi.org/10.1002/prot.21041>
- Lysenko, O., Schulte, D., Mittelbronn, M., & Steinle, A. (2013). BACL is a novel brain-associated, non-NKC-encoded mammalian C-type lectin-like receptor of the CLEC2 family. *PloS One*, 8(6), e65345. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0065345>
- Madara, J. L. (1990). Maintenance of the macromolecular barrier at cell extrusion sites in intestinal

-
- epithelium: Physiological rearrangement of tight junctions. *The Journal of Membrane Biology*, 116(2), 177–184. <http://doi.org/10.1007/BF01868675>
- Mahlaköiv, T., Hernandez, P., Gronke, K., Diefenbach, A., & Staeheli, P. (2015). Leukocyte-Derived IFN- α/β and Epithelial IFN- λ Constitute a Compartmentalized Mucosal Defense System that Restricts Enteric Virus Infections. *PLOS Pathogens*, 11(4), e1004782. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004782>
- Maley, F., Trimble, R. B., Tarentino, A. L., & Plummer, T. H. (1989). Characterization of glycoproteins and their associated oligosaccharides through the use of endoglycosidases. *Analytical Biochemistry*, 180(2), 195–204. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2510544>
- Martick, M., Horan, L. H., Noller, H. F., & Scott, W. G. (2008). A discontinuous hammerhead ribozyme embedded in a mammalian messenger RNA. *Nature*, 454(7206), 899–902. <http://doi.org/10.1038/nature07117>
- Matoulkova, E., Michalova, E., Vojtesek, B., & Hrstka, R. (2012). The role of the 3' untranslated region in post-transcriptional regulation of protein expression in mammalian cells. *RNA Biology*, 9(5), 563–576. <http://doi.org/10.4161/rna.20231>
- MATTHEW BJERKNES AND HAZEL CHENG. (2002). Multipotential stem cells in adult mouse gastric epithelium. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 283, G767–G777. Retrieved from <https://www.physiology.org/doi/pdf/10.1152/ajpgi.00415.2001>
- McAllister, C. S., Lakhdari, O., Pineton de Chambrun, G., Gareau, M. G., Broquet, A., Lee, G. H., ... Kagnoff, M. F. (2013). TLR3, TRIF, and caspase 8 determine double-stranded RNA-induced epithelial cell death and survival in vivo. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 190(1), 418–27. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.1202756>
- McGhee, J. R., & Fujihashi, K. (2012). Inside the Mucosal Immune System. *PLoS Biology*, 10(9), e1001397. <http://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001397>
- McWhirter, S. M., Fitzgerald, K. A., Rosains, J., Rowe, D. C., Golenbock, D. T., & Maniatis, T. (2004). IFN-regulatory factor 3-dependent gene expression is defective in Tbk1-deficient mouse embryonic fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(1), 233–8. <http://doi.org/10.1073/pnas.2237236100>
- Merril, C. R., Goldman, D., Sedman, S. A., & Ebert, M. H. (1981). Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. *Science (New York, N.Y.)*, 211(4489), 1437–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6162199>
- Meylan, E., Burns, K., Hofmann, K., Blancheteau, V., Martinon, F., Kelliher, M., & Tschopp, J. (2004).

-
- RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF- κ B activation. *Nature Immunology*, 5(5), 503–507. <http://doi.org/10.1038/ni1061>
- Mowat, A. M., & Agace, W. W. (2014). Regional specialization within the intestinal immune system. *Nature Reviews Immunology*, 14(10), 667–685. <http://doi.org/10.1038/nri3738>
- Natarajan, K., Sawicki, M. W., Margulies, D. H., & Mariuzza, R. A. (2000). Crystal structure of human CD69: a C-type lectin-like activation marker of hematopoietic cells. *Biochemistry*, 39(48), 14779–86. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11101293>
- Nava, P., Koch, S., Laukoetter, M. G., Lee, W. Y., Kolegraff, K., Capaldo, C. T., ... Nusrat, A. (2010). Interferon-gamma regulates intestinal epithelial homeostasis through converging beta-catenin signaling pathways. *Immunity*, 32(3), 392–402. <http://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.03.001>
- Neunlist, M., Van Landeghem, L., Mahé, M. M., Derkinderen, P., des Varannes, S. B., & Rolli-Derkinderen, M. (2013). The digestive neuronal–glial–epithelial unit: a new actor in gut health and disease. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 10(2), 90–100. <http://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.221>
- O'Neill, L. A. J., Golenbock, D., & Bowie, A. G. (2013). The history of Toll-like receptors — redefining innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 13(6), 453–460. <http://doi.org/10.1038/nri3446>
- Ogura, Y., Bonen, D. K., Inohara, N., Nicolae, D. L., Chen, F. F., Ramos, R., ... Cho, J. H. (2001). A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*, 411(6837), 603–606. <http://doi.org/10.1038/35079114>
- Orbelyan, G. A., Tang, F., Sally, B., Solus, J., Meresse, B., Ciszewski, C., ... Jabri, B. (2014). Human NKG2E is expressed and forms an intracytoplasmic complex with CD94 and DAP12. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 193(2), 610–6. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.1400556>
- Orr, M. T., & Lanier, L. L. (2011). Natural Killer Cell Licensing During Viral Infection. In *Advances in experimental medicine and biology* (Vol. 780, pp. 37–44). http://doi.org/10.1007/978-1-4419-5632-3_4
- Ouellette, A. J., Miller, S. I., Henschen, A. H., & Selsted, M. E. (1992). Purification and primary structure of murine cryptdin-1, a Paneth cell defensin. *FEBS Letters*, 304(2–3), 146–148. [http://doi.org/10.1016/0014-5793\(92\)80606-H](http://doi.org/10.1016/0014-5793(92)80606-H)
- Perez-Moreno, M., & Fuchs, E. (2006). Catenins: Keeping Cells from Getting Their Signals Crossed. *Developmental Cell*, 11(5), 601–612. <http://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.10.010>
- Peterson, L. W., & Artis, D. (2014). Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nature Reviews Immunology*, 14(3), 141–53.

-
- <http://doi.org/10.1038/nri3608>
- Pinto, D., & Clevers, H. (2005). Wnt control of stem cells and differentiation in the intestinal epithelium. *Experimental Cell Research*, 306(2), 357–63.
<http://doi.org/10.1016/j.yexcr.2005.02.022>
- Plewnia, G., Schulze, K., Hunte, C., Tampé, R., & Koch, J. (2007). Modulation of the Antigenic Peptide Transporter TAP by Recombinant Antibodies Binding to the Last Five Residues of TAP1.
<http://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.02.102>
- Plougastel, B., Dubbelde, C., & Yokoyama, W. M. (2001). Cloning of Clr, a new family of lectin-like genes localized between mouse Nkrp1a and Cd69. *Immunogenetics*, 53(3), 209–14. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11398965>
- Plougastel, B. F. M., & Yokoyama, W. M. (2006). Extending missing-self? Functional interactions between lectin-like NKrp1 receptors on NK cells with lectin-like ligands. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 298, 77–89. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16323412>
- Porter, E. M., Bevins, C. L., Ghosh, D., & Ganz, T. (2002). The multifaceted Paneth cell. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 59(1), 156–70. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11846026>
- Pott, J., & Hornef, M. (2012). Innate immune signalling at the intestinal epithelium in homeostasis and disease. *EMBO Reports*, 13(8), 684–698. <http://doi.org/10.1038/embor.2012.96>
- Pott, J., Mahlakoiv, T., Mordstein, M., Duerr, C. U., Michiels, T., Stockinger, S., ... Hornef, M. W. (2011). IFN-λ determines the intestinal epithelial antiviral host defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(19), 7944–7949. <http://doi.org/10.1073/pnas.1100552108>
- Pyż, E., & Brown, G. D. (2011). Screening for ligands of C-type lectin-like receptors. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 748, 1–19. http://doi.org/10.1007/978-1-61779-139-0_1
- Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S., & Medzhitov, R. (2004). Recognition of Commensal Microflora by Toll-Like Receptors Is Required for Intestinal Homeostasis. *Cell*, 118(2), 229–241. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2004.07.002>
- Rehm, H., & Letzel, T. (2009). *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics* (6. Auflage). Spektrum Akademischer Verlag.
- Rosen, D. B., Cao, W., Avery, D. T., Tangye, S. G., Liu, Y.-J., Houchins, J. P., & Lanier, L. L. (2008). Functional consequences of interactions between human NKR-P1A and its ligand LLT1 expressed on activated dendritic cells and B cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. :*

-
- 1950), 180(10), 6508–17. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18453569>
- Salomon, F.-V., Gille, U., & Geyer, H. (2008). *Anatomie für die Tiermedizin* (2.). Stuttgart: Enke.
- Sato, T., Vries, R. G., Snippert, H. J., van de Wetering, M., Barker, N., Stange, D. E., ... Clevers, H. (2009a). Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature*, 459(7244), 262–5. <http://doi.org/10.1038/nature07935>
- Sato, T., Vries, R. G., Snippert, H. J., van de Wetering, M., Barker, N., Stange, D. E., ... Clevers, H. (2009b). Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature*, 459(7244), 262–265. <http://doi.org/10.1038/nature07935>
- Schnell, U., Cirulli, V., & Giepmans, B. N. G. (2013). EpCAM: Structure and function in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1828(8), 1989–2001. <http://doi.org/10.1016/J.BBAMEM.2013.04.018>
- Schön, M. P., Arya, A., Murphy, E. A., Adams, C. M., Strauch, U. G., Agace, W. W., ... Parker, C. M. (1999). Mucosal T lymphocyte numbers are selectively reduced in integrin alpha E (CD103)-deficient mice. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 162(11), 6641–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10352281>
- Schonhoff, S. E., Giel-Moloney, M., & Leiter, A. B. (2004). Minireview: Development and differentiation of gut endocrine cells. *Endocrinology*, 145(6), 2639–44. <http://doi.org/10.1210/en.2004-0051>
- Schwerk, J., Köster, M., Hauser, H., Rohde, M., Fulde, M., Hornef, M. W., & May, T. (2013). Generation of Mouse Small Intestinal Epithelial Cell Lines That Allow the Analysis of Specific Innate Immune Functions. *PLoS ONE*, 8(8), e72700. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0072700>
- Scott, W. G., Horan, L. H., Martick, M., & Mol Biol Transl Sci, P. (2013). The Hammerhead Ribozyme: Structure, Catalysis and Gene Regulation. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 120, 1–23. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-381286-5.00001-9>
- Sharma, S., tenOever, B. R., Grandvaux, N., Zhou, G.-P., Lin, R., & Hiscott, J. (2003). Triggering the Interferon Antiviral Response Through an IKK-Related Pathway. *Science*, 300(5622), 1148–1151. <http://doi.org/10.1126/science.1081315>
- Sheridan, B. S., & Lefrançois, L. (2010). Intraepithelial Lymphocytes: To Serve and Protect. *Curr. Gastroenterol. Rep.*, 12 (6), 513–521. <http://doi.org/10.1007/s11894-010-0148-6>
- Skalova, T., Kotynkova, K., Duskova, J., Hasek, J., Kovai, T., Kolenko, P., ... Dohnalek, J. (2012). Mouse Clr-g, a Ligand for NK Cell Activation Receptor NKR-P1F: Crystal Structure and Biophysical

-
- Properties. *The Journal of Immunology*, 189(10), 4881–4889.
<http://doi.org/10.4049/jimmunol.1200880>
- Smith, P. D., MacDonald, T. T., & Blumberg, R. S. (Richard S. (2013). *Principles of mucosal immunology*. New York: Garland Science. Retrieved from https://www.amazon.de/Principles-Mucosal-Immunology-Society/dp/0815344430/ref=sr_1_1?s=books-intl-de&ie=UTF8&qid=1529678508&sr=1-1&keywords=Principles+of+Mucosal+Immunology
- Snoeck, V., Goddeeris, B., & Cox, E. (2005). The role of enterocytes in the intestinal barrier function and antigen uptake. *Microbes and Infection / Institut Pasteur*, 7(7–8), 997–1004.
<http://doi.org/10.1016/j.micinf.2005.04.003>
- Sonnenberg, G. F., Fouser, L. A., & Artis, D. (2011). Border patrol: regulation of immunity, inflammation and tissue homeostasis at barrier surfaces by IL-22. *Nature Immunology*, 12(5), 383–390. <http://doi.org/10.1038/ni.2025>
- Spreu, J., Kienle, E. C., Schrage, B., & Steinle, A. (2007). CLEC2A: a novel, alternatively spliced and skin-associated member of the NKC-encoded AICL–CD69–LLT1 family. *Immunogenetics*, 59(12), 903–912. <http://doi.org/10.1007/s00251-007-0263-1>
- Spreu, J., Kuttruff, S., Stejfova, V., Dennehy, K. M., Schitteck, B., & Steinle, A. (2010). Interaction of C-type lectin-like receptors Nkp65 and KACL facilitates dedicated immune recognition of human keratinocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(11), 5100–5. <http://doi.org/10.1073/pnas.0913108107>
- Suzuki, K., Oida, T., Hamada, H., Hitotsumatsu, O., Watanabe, M., Hibi, T., ... Ishikawa, H. (2000). Gut cryptopatches: direct evidence of extrathymic anatomical sites for intestinal T lymphopoiesis. *Immunity*, 13(5), 691–702. [http://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)00068-6](http://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)00068-6)
- Tian, H., Biehs, B., Warming, S., Leong, K. G., Rangell, L., Klein, O. D., & de Sauvage, F. J. (2011). A reserve stem cell population in small intestine renders Lgr5-positive cells dispensable. *Nature*, 478(7368), 255–9. <http://doi.org/10.1038/nature10408>
- Tian, W., Nunez, R., Cheng, S., Ding, Y., Tumang, J., Lyddane, C., ... Liou, H.-C. (2005). C-type lectin OCILRP2/Clr-g and its ligand NKRP1f costimulate T cell proliferation and IL-2 production. *Cellular Immunology*, 234(1), 39–53. <http://doi.org/10.1016/j.cellimm.2005.04.021>
- Trimble, R. B., & Tarentino, A. L. (1991). Identification of distinct endoglycosidase (endo) activities in *Flavobacterium meningosepticum*: endo F1, endo F2, and endo F3. Endo F1 and endo H hydrolyze only high mannose and hybrid glycans. *The Journal of Biological Chemistry*, 266(3), 1646–51. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1899092>

-
- Trudler, D., Farfara, D., & Frenkel, D. (2010). Toll-like receptors expression and signaling in glia cells in neuro-amyloidogenic diseases: towards future therapeutic application. *Mediators of Inflammation*, 2010. <http://doi.org/10.1155/2010/497987>
- Ulluwishewa, D., Anderson, R. C., McNabb, W. C., Moughan, P. J., Wells, J. M., & Roy, N. C. (2011). Regulation of Tight Junction Permeability by Intestinal Bacteria and Dietary Components. *Journal of Nutrition*, 141(5), 769–776. <http://doi.org/10.3945/jn.110.135657>
- Vadstrup, K., Galsgaard, E. D., Jensen, H., Lanier, L. L., Ryan, J. C., Chen, S.-Y., ... Bendtsen, F. (2017). NKG2D ligand expression in Crohn's disease and NKG2D-dependent stimulation of CD8+ T cell migration. *Experimental and Molecular Pathology*, 103(1), 56–70. <http://doi.org/10.1016/j.yexmp.2017.06.010>
- van den Ent, F., & Löwe, J. (2006). RF cloning: A restriction-free method for inserting target genes into plasmids. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 67(1), 67–74. <http://doi.org/10.1016/j.jbbm.2005.12.008>
- van Es, J. H., de Geest, N., van de Born, M., Clevers, H., & Hassan, B. A. (2010). Intestinal stem cells lacking the Math1 tumour suppressor are refractory to Notch inhibitors. *Nature Communications*, 1, 18. <http://doi.org/10.1038/ncomms1017>
- Van Regenmortel, M. H. V. (1987). Protein structure and antigenicity. *International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part B. Nuclear Medicine and Biology*, 14(4), 277–280. [http://doi.org/10.1016/0883-2897\(87\)90003-1](http://doi.org/10.1016/0883-2897(87)90003-1)
- Verdijk, R. M., Mutis, T., Esendam, B., Kamp, J., Melief, C. J., Brand, A., & Goulmy, E. (1999). Polyriboinosinic polyribocytidylic acid (poly(I:C)) induces stable maturation of functionally active human dendritic cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 163(1), 57–61. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10384099>
- Vidal, K., Grosjean, I., evillard, J. P., Gespach, C., & Kaiserlian, D. (1993). immortalization of mouse intestinal epithelial cells by the SV40-large T gene. Phenotypic and immune characterization of the MODE-K cell line. *Journal of Immunological Methods*, 166(1), 63–73. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7693823>
- Vogler, I., & Steinle, A. (2011). Vis-à-vis in the NKC: genetically linked natural killer cell receptor/ligand pairs in the natural killer gene complex (NKC). *Journal of Innate Immunity*, 3(3), 227–35. <http://doi.org/10.1159/000324112>
- Vontell, R., Supramaniam, V., Thornton, C., Wyatt-Ashmead, J., Mallard, C., Gressens, P., ... Hagberg, H. (2013). Toll-Like Receptor 3 Expression in Glia and Neurons Alters in Response to White

-
- Matter Injury in Preterm Infants. *Developmental Neuroscience*, 35(2–3), 130–139.
<http://doi.org/10.1159/000346158>
- Weigmann, B., Tubbe, I., Seidel, D., Nicolaev, A., Becker, C., & Neurath, M. F. (2007). Isolation and subsequent analysis of murine lamina propria mononuclear cells from colonic tissue. *Nature Protocols*, 2(10), 2307–2311. <http://doi.org/10.1038/nprot.2007.315>
- Weis, W. I., & Drickamer, K. (1996). Structural Basis of Lectin-Carbohydrate Recognition. *Annual Review of Biochemistry*, 65(1), 441–473. <http://doi.org/10.1146/annurev.bi.65.070196.002301>
- Welte, S., Kuttruff, S., Waldhauer, I., & Steinle, A. (2006). Mutual activation of natural killer cells and monocytes mediated by NKp80-AICL interaction. *Nature Immunology*, 7(12), 1334–1342.
<http://doi.org/10.1038/ni1402>
- Williams, K. J. N., Wilson, E., Davidson, C. L., Aguilar, O. A., Fu, L., Carlyle, J. R., & Burshtyn, D. N. (2012). Poxvirus Infection-Associated Downregulation of C-Type Lectin-Related-b Prevents NK Cell Inhibition by NK Receptor Protein-1B. *The Journal of Immunology*, 188(10), 4980–4991.
<http://doi.org/10.4049/jimmunol.1103425>
- Williams, S. J., Wreschner, D. H., Tran, M., Eyre, H. J., Sutherland, G. R., & McGuckin, M. A. (2001). Muc13, a novel human cell surface mucin expressed by epithelial and hemopoietic cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(21), 18327–36. <http://doi.org/10.1074/jbc.M008850200>
- Yilmaz, Ö. H., Katajisto, P., Lamming, D. W., Gültekin, Y., Bauer-Rowe, K. E., Sengupta, S., ... Sabatini, D. M. (2012). mTORC1 in the Paneth cell niche couples intestinal stem-cell function to calorie intake. *Nature*, 486(7404), 490–5. <http://doi.org/10.1038/nature11163>
- Yokoyama, W. M., Kehn, P. J., Cohen, D. I., & Shevach, E. M. (1990). Chromosomal location of the Ly-49 (A1, YE1/48) multigene family. Genetic association with the NK 1.1 antigen. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 145(7), 2353–8. Retrieved from
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1975828>
- Yokoyama, W. M., & Plougastel, B. F. M. (2003). Immune functions encoded by the natural killer gene complex. *Nature Reviews. Immunology*, 3(4), 304–16. <http://doi.org/10.1038/nri1055>
- Yokoyama, W. M., & Seaman, W. E. (1993). The Ly-49 and NKR-P1 Gene Families Encoding Lectin-Like Receptors on Natural Killer Cells: The NK Gene Complex. *Annual Review of Immunology*, 11(1), 613–635. <http://doi.org/10.1146/annurev.iy.11.040193.003145>
- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., ... Fujita, T. (2004). The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nature Immunology*, 5(7), 730–737. <http://doi.org/10.1038/ni1087>

-
- Zelensky, A. N., & Gready, J. E. (2005). The C-type lectin-like domain superfamily. *FEBS Journal*, 272(24), 6179–6217. <http://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.05031.x>
- Zhang, Q., Rahim, M., Allan, D. S. J., Tu, M. M., & Belanger, S. (2012). Mouse Nkrp1-Clr Gene Cluster Sequence and Expression Analyses Reveal Conservation of Tissue-Specific MHC-Independent Immunosurveillance. *PLoS ONE*, 7(12), 50561. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0050561>
- Zhang, Q., Rahim, M. M. A., Allan, D. S. J., Tu, M. M., Belanger, S., Abou-Samra, E., ... Makrigiannis, A. P. (2012). Mouse Nkrp1-Clr Gene Cluster Sequence and Expression Analyses Reveal Conservation of Tissue-Specific MHC-Independent Immunosurveillance. *PLoS ONE*, 7(12), e50561. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0050561>
- Zhou, R., Wei, H., Sun, R., & Tian, Z. (2007). Recognition of Double-Stranded RNA by TLR3 Induces Severe Small Intestinal Injury in Mice. *The Journal of Immunology*, 178(7), 4548–4556. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.178.7.4548>

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich meine Dissertation selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt und noch keinen Promotionsversuch unternommen habe.

Rutkowski, Emilia

Erklärung der Übereinstimmung

Emilia Rutkowski
60594 Frankfurt am Main

19.12.2018

Ich erkläre hiermit, dass die elektronische Version der Doktorarbeit mit der schriftlichen Version übereinstimmt. Die elektronische Version liegt dem Prüfungssekretariat vor.

Rutkowski, Emilia

Curriculum Vitae

Emilia Rutkowski

Geburtsdatum: 24.08.1985

Geburtsort: Wabrzezno, Polen

BERUFLICHER WERDEGANG

seit 2017	Clinical Research Associate (CRA) Freiberuflich/Selbständig, i.A. Pharmaunternehmen
2011 - 2016	Wissenschaftliche Angestellte am Institut für Molekulare Medizin, Frankfurt am Main, Hessen (Prof. Steinle), Durchführung der experimentellen Arbeit im Rahmen der Promotion 2013 - 2016
2010 - 2011	Diplomarbeit bei Merck, Darmstadt, Abteilung: Protein and Cell Sciences „Neue Zugänge zur Identifizierung einer löslichen Variante der katalytischen Domäne einer therapeutisch relevanten Kinase“ (Prof. Kolmar)
2005 - 2011	Studium der Biologie an der Technischen Universität Darmstadt, Hessen Schwerpunkte: Biochemie, Tierphysiologie, Strahlenbiologie, Zell- und Entwicklungsbiologie, Abschluss: Diplom-Biologin
1996 – 2005	Ottheinrich-Gymnasium, Wiesloch, Baden-Württemberg Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

PUBLIKATIONEN/KONGRESSBEITRÄGE

2017 (JBC)	“The activating C-type lectin-like receptor NKp65 signals through a HemITAM and Syk kinase” Björn Bauer, Tanja Wotapek, Tobias Zöller, <u>Emilia Rutkowski</u> , and Alexander Steinle
2017 (Journal of Immunology)	“Clr-a: A novel Immune-Related C-Type Lectin-like Molecule Exclusively Expressed by Mouse Gut Epithelium” <u>Emilia Rutkowski</u> , Stefan Leibelt, Christina Born, Miriam E. Friede, Stefan Bauer, Sandra Weil, Joachim Koch and Alexander Steinle
2015 (Mucosal Immunology)	“Dedicated immunosensing of the mouse intestinal epithelium facilitated by a pair of genetically coupled lectin-like receptors” Leibelt S, Friede ME, Rohe C, Gütle D, <u>Rutkowski E</u> , Weigert A, Kveberg L, Vaage JT, Hornef MW, Steinle A.
2015	European Congress of Immunology in Wien (Poster)
2013	Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie in Mainz (Poster)
2012	European Congress of Immunology in Glasgow (Poster)
2012	Natural Killer Cell Symposium in Heidelberg (Poster)

Frankfurt am Main,

Rutkowski, Emilia

